



Patent

Attorney's Docket No. 032735-004

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application of)
Yasushi SHIGEMORI et al.) Group Art Unit: 1645
Application No.: 09/989,526) Examiner: Unassigned
Filed: November 21, 2001) Confirmation No.: 9938
For: METHOD FOR DETECTING DNA)
POLYMORPHISM APPLYING TRIPLE)
STRAND DNA FORMATION)
TECHNIQUE)

RECEIVED
JUL 15 2002
TECH CENTER 1600/2900

CLAIM FOR CONVENTION PRIORITY

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

The benefit of the filing date of the following prior foreign application in the following foreign country is hereby requested, and the right of priority provided in 35 U.S.C. § 119 is hereby claimed:

Japanese Patent Application No. 2000/386361

Filed: December 20, 2000

In support of this claim, enclosed is a certified copy of said prior foreign application. Said prior foreign application was referred to in the oath or declaration. Acknowledgment of receipt of the certified copy is requested.

Respectfully submitted,

BURNS, DOANE, SWECKER & MATHIS, L.L.P.

Date: July 12, 2002

By: Susan M. Dadio
Susan M. Dadio
Registration No. 40,373

P.O. Box 1404
Alexandria, Virginia 22313-1404
(703) 836-6620



日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office

出 願 年 月 日
Date of Application:

2000年12月20日

出 願 番 号
Application Number:

特願2000-386361

[ST.10/C]:

[JP2000-386361]

出 願 人
Applicant(s):

株式会社アイシン・コスモス研究所
財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所

TECH CENTER 1600/2900

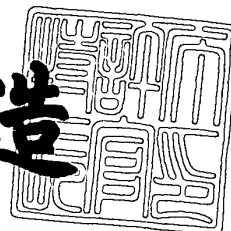
JUL 15 2002

RECEIVED

2002年 5月27日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2002-3038997

【書類名】 特許願

【特記事項】 特許法第 3 0 条第 1 項の規定の適用を受けようとする特
許出願

【整理番号】 AIC-101

【提出日】 平成12年12月20日

【あて先】 特許庁長官殿

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県木更津市矢那 1 6 9 8 番地 株式会社アイシン・
コスモス研究所内

【氏名】 重森 康司

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県木更津市矢那 1 5 3 2 番 3 号 財団法人かずさデ
ィー・エヌ・エー研究所内

【氏名】 大石 道夫

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県木更津市矢那 1 5 3 2 番 3 号 財団法人かずさデ
ィー・エヌ・エー研究所内

【氏名】 小原 収

【特許出願人】

【識別番号】 593043200

【氏名又は名称】 株式会社アイシン・コスモス研究所

【特許出願人】

【識別番号】 596175810

【氏名又は名称】 財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所

【代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 三本鎖DNA形成技術を応用したDNA多型検出方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】以下の（a）から（d）の工程を含む、二本鎖DNA中の多型を検出する方法。

（a）三本鎖DNA複合体を形成させる反応条件下において、被検多型部位を含む二本鎖DNA、該二本鎖DNAの多型部位を含む領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブ、および相同組換えタンパク質を接触させる工程、

（b）工程（a）によって形成される三本鎖DNA複合体から相同組換えタンパク質を除去する工程、

（c）二本鎖DNA中の被検多型部位と該オリゴヌクレオチドプローブの対応する部位とが相補的でない場合に、相同組換えタンパク質が除去された三本鎖DNAからオリゴヌクレオチドプローブが遊離する条件下で、該三本鎖DNAに熱処理を施す工程、

（d）二本鎖DNAと結合して三本鎖DNAを形成しているオリゴヌクレオチドプローブを検出する工程。

【請求項2】被検多型部位を含む二本鎖DNAが、DNA末端を有するものである請求項1に記載の方法。

【請求項3】被検多型部位がDNA末端から20ベース以内に位置する請求項2に記載の方法。

【請求項4】オリゴヌクレオチドプローブの長さが20～120ベースである請求項1に記載の方法。

【請求項5】相同組換えタンパク質が大腸菌RecAタンパク質である請求項1に記載の方法。

【請求項6】工程（a）において、反応系にヌクレオチド三リン酸を加える請求項1に記載の方法。

【請求項7】工程（b）において、相同組換えタンパク質の除去を、タンパク質分解酵素処理を施すことによって行う請求項1に記載の方法。

【請求項8】タンパク質分解酵素がプロテイナーゼKである請求項7に記載

の方法。

【請求項 9】以下の要素を含む、被検多型部位を含む二本鎖DNA中の多型を検出するためのキット。

(a) 被検多型部位を含む二本鎖DNAにハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブ

(b) 相同組換えタンパク質

【請求項 10】相同組換えタンパク質を除去するための試薬、ヌクレオチド三リン酸、および緩衝剤からなる群より選択される少なくとも1つをさらに含む請求項 9 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、相同組換えタンパク質を利用したDNA多型を検出する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

ヒトの疾患やさまざまな表現形質の違いは、個々のヒトゲノムの塩基配列における1塩基多型(SNP; single nucleotide polymorphism)と呼ばれるDNA塩基配列の違いによることが知られている。SNPはヒトゲノム約30億塩基対の中での全域にわたって存在し、総数は300万個以上にもなる。このことから、従来のDNAマーカーであるRFLP(restriction fragment length polymorphism; 制限酵素断片長多型)マーカー、およびSTR(マイクロサテライト)と比べても桁違いの高密度DNAマーカーと言える。従って、SNPの利用により従来のDNAマーカーでは不可能であった高精度な解析が可能となり、例えば、ヒト疾患の原因遺伝子の探索、疾患感受性の判定、および医薬品開発等への応用が期待されている。

【0003】

SNPを含めDNAの多型を検出する方法としてはこれまでのところ、例えば以下のような方法が知られている。

(1) PCR-SSCP (single-strand conformation polymorphism)

PCR増幅された2本鎖DNA断片をゲル電気泳動で分離した場合、その移動度はDNA分子の大きさに比例する。1本鎖DNA分子は、変性剤を含むゲルで泳動した場合は、その分子の大きさに比例するが、変性剤を含まないゲルで泳動した場合、1本鎖DNAは分子内相互作用によって折り畳まれ構造（高次構造）を形成する。このように立体構造を形成したDNAは、その構造の相違に依存してゲル電気泳動の移動度が変化する。すなわち、PCR-SSCPの方法は、PCR増幅した2本鎖DNAを熱やアルカリで処理して変性させ、1本鎖にした後、変性剤を含まないポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけることにより、ゲル中で1本鎖DNAは分子内相互作用により折り畳まれ、高次構造を形成する。その折り畳まれ構造の相互作用は、塩基の相違であっても変化する。その差違は、泳動されたDNA断片を染色することによって検出される。通常、DNAの検出に広く利用されているエチジウムブロマイドは、2本鎖DNAを染色するが、1本鎖DNAをほとんど染色しない。そのため、この方法の染色には銀染色が応用されている。

【 0 0 0 4 】

しかしながらこの技術には、サーチする領域が200～300 bpであり、それ以下であると、検出が困難であるという問題があった。

【 0 0 0 5 】

(2) 直接塩基配列決定法

直接塩基配列決定法は、PCR増幅したDNA鎖を鋳型として、ベクターにサブクローニングなどを行わないで、直接塩基配列を決定する方法である。この方法は、PCRの欠点である読み違いを解消することができる。PCRでの読み違いは400bpに1つの割合で起こるといわれており、サブクローニングした後では、400塩基に1つの割合で塩基変異が検出されるはずである。ランダムに導入された誤った塩基配列は、平均1/400に希釈されるので、直接塩基配列決定法ではほとんど無視することができる。この方法は、PCR増幅したDNA鎖を非対称PCRと呼ばれる二次PCRを行い一本鎖DNA増幅して、一般的にはジデオキシ法を用いて塩基配列を決定する。この二次PCRは、一組のプライマーの一方を制限量にして（通常は1:10～1:100）PCRを行うことによって一本鎖DNAの増幅を行う。

【 0 0 0 6 】

しかしこの技術は、遺伝子を片っ端から解読する方法であり、変異を見つけれ
る確率は低い。また、シーケンサー装置の問題もあり、変異を見逃してしまう
恐れがあった。

【 0 0 0 7 】

(3) IGCR法 (in-gel competitive reassociation)

微量差の構造変化を有するDNAのクローニング法として、ゲル中でのDNAの競合
的再会合(IGCR)を用いた方法がある。脱リン酸化処理したリファレンスDNAを用い
て、電気泳動ゲル内で変性、再会合後、DNAを回収してクローニングすることで
、構造変化のある標的DNA断片を特異的に濃縮する。

【 0 0 0 8 】

しかしこの技術は、PCR-SSCP法よりもさらに長い領域の変異を見つける方法で
あり、その反応の仕組み上、塩基の繰り返し配列は検出することができない等の
問題点があった。

【 0 0 0 9 】

従って、DNA中の多型を見つける際に、長いDNA探索領域を必要としない、効率
的でかつ確実性の高い多型を検出する方法の開発が望まれていた。

【 0 0 1 0 】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、DNA中
の多型の検出において長いDNA探索領域を必要とせず、検出感度の高い効率的なD
NA多型の新しい検出方法を提供することにある。

【 0 0 1 1 】

【課題を解決するための手段】

本発明者らはこれまでに、生体内におけるDNAの相同組換えについて鋭意研究
を行ってきた。その結果、相同組換えを司る大腸菌RecAタンパク質は、長い相同
領域を必要とせず三本鎖DNA構造を形成させるが、この三本鎖DNAが、そのうちの
二本鎖の中の1組のミスマッチの存在により、熱に対して不安定になることを見
出した。そして本発明者らは次のようなDNA多型の検出方法を想到した。まず、

【 0 0 1 3 】

相同組換えタンパク質による三本鎖DNAの形成には、少なくとも40bp以上の長さのDNAであればよいことから、被検DNAとして長いDNA領域を必要としない。さらに、相同組換えタンパク質による三本鎖DNA形成を介したプローブの標的DNAへの結合は、一般的なハイブリダイゼーションでみられるプローブの標的DNAへの結合よりも特異性が高いものと考えられることから、上記の方法は、従来の一般的なハイブリダイゼーションを利用したDNA多型の検出法より、検出感度が高いものといえる。

【 0 0 1 4 】

本発明者らは上記の如く、相同組換えタンパク質を利用することによりDNA多型を効率的に検出できる新しい方法を見出し、本発明を完成するに至った。

【 0 0 1 5 】

即ち、本発明はDNA中の多型の検出において長いDNA探索領域を必要とせず、検出感度の高い効率的なDNA多型の新しい検出方法に関し、より具体的には、

〔 1 〕 以下の（ a ） から（ d ） の工程を含む、二本鎖DNA中の多型を検出する方法、

（ a ） 三本鎖DNA複合体を形成させる反応条件下において、被検多型部位を含む二本鎖DNA、該二本鎖DNAの多型部位を含む領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブ、および相同組換えタンパク質を接触させる工程、

（ b ） 工程（ a ） によって形成される三本鎖DNA複合体から相同組換えタンパク質を除去する工程、

（ c ） 二本鎖DNA中の被検多型部位と該オリゴヌクレオチドプローブの対応する部位とが相補的でない場合に、相同組換えタンパク質が除去された三本鎖DNAからオリゴヌクレオチドプローブが遊離する条件下で、該三本鎖DNAに熱処理を施す工程、

（ d ） 二本鎖DNAと結合して三本鎖DNAを形成しているオリゴヌクレオチドプローブを検出する工程、

〔 2 〕 被検多型部位を含む二本鎖DNAが、DNA末端を有するものである〔 1 〕 に記載の方法、

〔3〕被検多型部位がDNA末端から20ベース以内に位置する〔2〕に記載の方法

〔4〕オリゴヌクレオチドプローブの長さが20～120ベースである〔1〕に記載の方法、

〔5〕相同組換えタンパク質が大腸菌 R e c A タンパク質である〔1〕に記載の方法、

〔6〕工程（a）において、反応系にヌクレオチド三リン酸を加える〔1〕に記載の方法、

〔7〕工程（b）において、相同組換えタンパク質の除去を、タンパク質分解酵素処理を施すことによって行う〔1〕に記載の方法、

〔8〕タンパク質分解酵素がプロティナーゼKである〔7〕に記載の方法、

〔9〕以下の要素を含む、被検多型部位を含む二本鎖DNA中の多型を検出するためのキット、

（a）被検多型部位を含む二本鎖DNAにハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブ

（b）相同組換えタンパク質

〔10〕相同組換えタンパク質を除去するための試薬、ヌクレオチド三リン酸、および緩衝剤からなる群より選択される少なくとも1つをさらに含む〔9〕に記載のキット、を提供するものである。

【0016】

【発明の実施の形態】

本発明は、相同組換えタンパク質を利用した標的DNA中の多型を検出するための新しい方法を提供する。本発明の方法においては、まず、三本鎖DNA複合体を形成させる反応条件下において、被検多型部位を含む二本鎖DNA、該二本鎖DNAの多型部位を含む領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブ、および相同組換えタンパク質を接触させる（工程（a）； 図11（A）参照）。

【0017】

本発明において「多型」とは、同一の生物ゲノムDNAの個体間における塩基の違いを意味する。本発明においては1塩基の違いからなる多型が検出対象として

好ましい。このような「多型」には1個の塩基が他の塩基に置き換わっているSNP (single nucleotide polymorphism)が含まれる。さらに1個の塩基が挿入されている変異、または1個の塩基が欠失している変異も含まれる。

【 0 0 1 8 】

本発明における「多型の検出」とは多型が存在するか否かを判定することに加えて、多型の種類が上記のSNPである場合に、A（アデニン）、T（チミン）、G（グアニン）、またはC（シトシン）のどの塩基に置換されているのかを判別する所謂「ジェノタイピング」も、本発明の「多型の検出」に含まれる。

【 0 0 1 9 】

本発明において「被検多型部位」とは検出すべき多型が存在するDNA配列上の塩基をいう。「被検多型部位を含む二本鎖DNA」とは、そのDNA配列上に被検多型部位が存在する二本鎖DNAを指す（本明細書においては単に「標的二本鎖DNA」あるいは「標的DNA」とも記載する）。該標的二本鎖DNAとしては、具体的には「被検多型部位」を含むゲノムDNAを挙げることができるが、これに限定されない。例えば、「被検多型部位」を含むDNA領域をPCRによって増幅したDNAフラグメントも、本発明の標的二本鎖DNAとして使用することができる。「被検多型部位」がオープン・リーディング・フレーム(ORF)上に存在する場合には、「被検多型部位」を含むDNAの転写産物であるRNAを鋳型として、RT-PCRにより増幅させた二本鎖DNA（cDNA）フラグメントもまた本発明の標的二本鎖DNAとして使用することができる。

【 0 0 2 0 】

標的二本鎖DNAは、DNA末端を持たない環状二本鎖DNAであってもよいし、DNA末端を有する線状DNAであってもよい。線状DNAのDNA末端は、好ましくは平滑なDNA末端であるが、一方の鎖が突出した構造を有するDNA末端であってもよい。

【 0 0 2 1 】

標的二本鎖DNA中の「被検多型部位」は、検出効率を高めるために、好ましくはDNA末端から20塩基対以内、さらに好ましくは10塩基対以内のDNA領域に存在することが望ましい。

【 0 0 2 2 】

また、「被検多型部位を含む二本鎖DNA」の長さには特に制限はないが、オリゴヌクレオチドプローブと効率的に三本鎖DNAを形成させるために、好ましくは40塩基対以上、さらに好ましくは60塩基対以上の長さである。また、長さの上限についても特に制限はないが、標的二本鎖DNAとしてPCR増幅産物が好適に用いられることから、通常100キロ塩基対以内、好ましくは50キロ塩基対以内である。

【 0 0 2 3 】

本発明の方法においては、従来の方法では検出が困難であった200塩基対以下の標的二本鎖DNAについても、多型の検出が可能である。

【 0 0 2 4 】

本発明の標的二本鎖DNAは、オリゴヌクレオチドプローブの検出方法によっては、蛍光色素等のマーカーで標識されうる。

【 0 0 2 5 】

本発明において「オリゴヌクレオチドプローブ」とは、標的二本鎖DNAの被検多型部位を含む領域にハイブリダイズする多型を検出するためのオリゴヌクレオチドである。本発明においては、該オリゴヌクレオチドプローブが、相同組換えタンパク質の作用により被検多型部位を含む二本鎖DNAと、三本鎖DNAを形成する。従って、本発明においてオリゴヌクレオチドプローブが「ハイブリダイズする」とは、三本鎖DNAを形成するようにオリゴヌクレオチドプローブが、標的二本鎖DNAと非共有結合（水素結合）することをいう。該オリゴヌクレオチドプローブは、被検多型部位を含む標的二本鎖DNAの一方の鎖と相補的な配列を有するものでなければならないが、必ずしも該標的DNAと完全に相補的でなくてもよい。即ち、相同組換えタンパク質によって標的二本鎖DNAと被検多型部位を含むDNA領域において三本鎖DNAを形成することが可能である程度に相補的であればよい。多型部位が予め判明している場合は、後述する態様で用いるために、多型部位に対応した位置の塩基のみが相補的でない配列を有するものであってもよい。即ち、オリゴヌクレオチドプローブ上の多型部位に対応する塩基は、その目的に応じてA（アデニン）、T（チミン）、G（グアニン）、C（シトシン）の各種塩基を用いることができる。

【 0 0 2 6 】

オリゴヌクレオチドプローブの配列において、被検多型部位を含むDNA領域と相補的であるDNA配列の長さは、標的二本鎖DNAと三本鎖DNAを形成可能な長さであれば特に制限はないが、通常20～120ベース、好ましくは40～120ベース、さらに好ましくは60～120ベースである。

【 0 0 2 7 】

また、オリゴヌクレオチドプローブの全体の長さは、標的二本鎖DNAと三本鎖DNAを形成し得る長さであれば特に制限はないが、好ましくは、20ベース以上であり、通常150ベース以内、好ましくは120ベース以内、さらに好ましくは60ベース以内である。

【 0 0 2 8 】

本発明のオリゴヌクレオチドプローブは、検出のための標識を施すことが好ましい。オリゴヌクレオチドの標識は当業者によって一般的に行われる方法によって行うことができる。例えば放射性同位元素 (^{32}P 、 ^{35}S 、 ^3H 等)、蛍光色素、検出可能なシグナルを産生する酵素的マーカーによって標識することができる。酵素マーカーは、本発明の熱処理の工程を考慮して、熱に安定なものが好ましい。

【 0 0 2 9 】

本発明における「相同組換えタンパク質」としては、その存在下において、標的二本鎖DNAとオリゴヌクレオチドプローブが、該タンパク質を介して安定な三本鎖DNAを形成しうるものであれば、起源を問うことなく、いかなるタンパク質も使用することができる。具体的には、大腸菌 (*Escherichia coli*) に由来するRecAタンパク質、耐熱性細菌 (*Thermus thermophilus*)、他の腸内細菌において、*recA*遺伝子によりコードされている多機能性タンパク質、また、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*)、枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、メチロフィルス・メチロトロファス (*Methylophilus methylotrophus*)、コレラ菌 (*Vibrio cholerae*)、ウスティラゴ・メイデイス (*Ustilago maydis*) 等に由来するRecA類似タンパク質等が挙げられる。また、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) やヒトに由来するRecA類似タンパク質も、本発明の相同組換えタンパク質に包含される。これらのうち、入手容易性、安定性、機能性の観点から、大腸菌に由来するRecAタンパク質、またはそれに類似する機能を有する

タンパク質（例えば、該タンパク質に由来する改変タンパク質もしくはその断片）を使用することが好ましい。改変タンパク質としては、*recA*遺伝子の部位特異的変異誘発等により作出された*recA*遺伝子産物であって、RecAタンパク質において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつRecAタンパク質と同様に三本鎖DNAを形成しうる機能を有するものを挙げることができる。数個のアミノ酸が欠失したのものには、RecAタンパク質の一本鎖DNAへの結合ドメインを含むタンパク質、もしくはペプチドが包含される。このようなペプチドの例としては、Voloshin et al., Science, Vol. 272, 1996 : 868-872に記載されているものを挙げることができる。なお本発明において「タンパク質」とは、ペプチドをも包含する意味で使用する。

【 0 0 3 0 】

本発明においては、上記標的二本鎖DNA、標的二本鎖DNAの多型部位を含む領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブ、および相同組換えタンパク質を接触させ、三本鎖DNAを形成させる。該三本鎖DNAの形成は、典型的には図5に略図的に示されているような様式で起こる。上記接触に際し、ヌクレオシド三リン酸(dATP, dUTP, dCTP, dTTP, dGTP, ATP, TTP, CTP, UTP, GTP)を共存させることが好ましいか、もしくは必要である。このようなヌクレオシド三リン酸としては、アデノシン5'-三リン酸(ATP)またはその類縁体、例えば（アデノシン（ γ -チオ）-三リン酸(ATP- γ S), GDP- γ S, AMP-PNP)あるいはNTP(ATP, TTP, GTP, CTP)の再生系(NTP + Phosphocreatine + creatine phosphokinase)などを挙げることができる。なお、上記複合体を形成する系において、例えば、ATPが生物学的な分解を伴うような場合には、ATP- γ Sを使用するのが好ましい。

【 0 0 3 1 】

上記接触は、適当な液体媒質、例えば適当な緩衝剤によって緩衝化されていてもよい水溶液中で行う。緩衝剤を使用する場合は、例えばトリス（例えば、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン）と適当な酸（例えば酢酸、塩酸等）とによりpHを6.5~7.5、好ましくは約7.2に調節したトリス系の緩衝液を使用する。緩衝剤は一般に10mM~50mM、好ましくは約30mMで使用する。このような液体媒質中において、上記標的二本鎖DNA、オリゴヌクレオチドプローブ、および相同組

換えタンパク質を混合し、必要に応じてヌクレオシド三リン酸を加えインキュベートすることにより、上記「接触」が行われる。

【 0 0 3 2 】

標的二本鎖DNA、およびオリゴヌクレオチドプローブは、三本鎖DNAを形成するのに悪影響が生じない範囲であれば、それらの使用割合はいずれであってもよい。また、相同組換えタンパク質の使用割合は、三本鎖DNA構造を形成する標的二本鎖DNA、およびオリゴヌクレオチドプローブの鎖長に依存して変動しうるが、一般的に三本鎖DNAを構成するそれぞれの鎖のヌクレオチド数を上回るモル量で、好ましくはヌクレオチド3個に対してほぼ1モル量とするのがよい。

【 0 0 3 3 】

上記のように調製された混合液は、4～54℃、好ましくは約37℃において15分以上、通常約30分間インキュベートする。これにより三本鎖DNAを形成することができる。

【 0 0 3 4 】

こうして形成される三本鎖DNAは、通常少なくとも三本鎖構造部分に相同組換えタンパク質が結合した複合体（本明細書においては、「三本鎖DNA複合体」と記載する。）の形態で存在する。本発明において「三本鎖DNA複合体」とは、三本鎖DNAに相同組換えタンパク質が結合した状態の構造体をいう。三本鎖DNA複合体は、適当な精製法、例えば、フェノール・クロロホルム抽出、ゲル濾過法、各種電気泳動法等により反応混合液から分離することができる。こうして分離された複合体は、生体外の通常の生理学的な条件下で安定である。

【 0 0 3 5 】

また、工程（a）において、被検多型部位を含む二本鎖DNA、該二本鎖DNAの多型部位を含む領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブ、および相同組換えタンパク質を接触させる順番については特に制限はないが、好ましくは、相同組換えタンパク質とオリゴヌクレオチドプローブを接触させ相同組換えタンパク質／プローブ複合体を形成させた後、被検多型部位を含む二本鎖DNAを該複合体と接触させる。

【 0 0 3 6 】

本発明においては、次いで、工程（a）によって形成される三本鎖DNA複合体から相同組換えタンパク質を除去する（工程（b）； 図11（B）参照）。

【0037】

本工程においては、通常、相同組換えタンパク質をタンパク質分解酵素で処理することにより、三本鎖DNA複合体から相同組換えタンパク質の除去を行うことができる。

【0038】

タンパク質分解酵素は、一般的に「プロテアーゼ(protease)」、「プロティナーゼ(proteinase)」、あるいは「ペプチダーゼ」とも呼ばれる場合があるが、これらも本発明のタンパク質分解酵素に含まれる。本発明のタンパク質分解酵素として、例えば、プロティナーゼK等を好適に用いることができる。タンパク質分解酵素処理は、使用する酵素の種類に応じて、当業者においては反応液、反応条件等を適宜判断して実施することができる。具体的には、十分な除タンパク効果を得るために、反応温度は37℃で、反応時間は20分以上で行うことが好ましい。また、三本鎖DNAが解離しないようにするために、反応は50℃以下で行うことが好ましい。

【0039】

また、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS; sodium dodecyl sulfate)処理、塩酸グアニジン処理、または熱処理等によっても、本工程の三本鎖DNA複合体からの相同組換えタンパク質の除去を行うことは可能である。

【0040】

こうして除タンパク質処理された三本鎖DNA構造体もまた、生体外の通常の生理学的な条件下で安定である。

【0041】

また、本工程の後、三本鎖DNAを形成しないオリゴヌクレオチドプローブの除去を行うことができる。

【0042】

本発明においては、次いで、標的二本鎖DNA中の被検多型部位と本発明のオリゴヌクレオチドプローブの対応する部位とが相補的でない場合に、相同組換えタ

ンパク質が除去された三本鎖DNAからオリゴヌクレオチドプローブが遊離する条件下で、該三本鎖DNAに熱処理を施す（工程（c）； 図11（C）参照）。

【0043】

「標的二本鎖DNA中の被検多型部位と該オリゴヌクレオチドプローブの対応する部位が相補的でない」とは、被検多型部位を含む二本鎖DNAとオリゴヌクレオチドプローブがハイブリダイズする際、該多型部位の塩基と、相対する位置のオリゴヌクレオチドプローブ上の塩基とが相補的ではないことをいう。被検多型が挿入または欠失変異である場合、該多型に相対するオリゴヌクレオチドプローブ上の塩基は存在しないが、この場合も上記の「相補的でない」の意に含まれる。

【0044】

標的二本鎖DNA中の被検多型部位とオリゴヌクレオチドプローブの対応する部位とが、相補的である場合に形成される三本鎖DNAと、相補的でない場合に形成される三本鎖DNAとは、熱に対する安定性に差があることが本発明者らによって見出された。つまり、標的二本鎖DNA中の被検多型部位とオリゴヌクレオチドプローブの対応する部位とが相補的でない場合に形成される三本鎖DNAであった場合には、適当な条件で熱処理を施すことにより、三本鎖の中の一本を構成するオリゴヌクレオチドプローブ（以下「ミスマッチプローブ」とも記載する）を遊離させることができる。相補的である場合に形成される三本鎖DNAからはオリゴヌクレオチドプローブは遊離せず、相補的でない場合に形成される三本鎖DNAからはオリゴヌクレオチドプローブが遊離させるための熱処理の温度条件は、三本鎖DNAを構成する標的二本鎖DNAの長さ、オリゴヌクレオチドプローブの長さ、およびこれらDNAの塩基配列、これらDNA間の相補性の程度、反応液の組成(Tris濃度)等の諸条件によって変動するが、当業者においては、実験または経験によって最適な条件（反応液の組成、熱処理温度等）を適宜選択することが可能である。具体的には、実施例5（図6）で示した条件で行うことができる。一般に、反応液中のTris濃度を下げるとミスマッチプローブが三本鎖DNAから遊離しやすくなり、Tris濃度を上げると遊離しにくくなる。従って、長いオリゴヌクレオチドプローブを使用する場合には、Tris濃度を下げ、短いオリゴヌクレオチドプローブを使用する場合にはTris濃度を上げることが好ましい。

【0045】

本発明においては、次いで、標的二本鎖DNAと結合して三本鎖DNAを形成しているオリゴヌクレオチドプローブを検出する（工程（d））。

【0046】

好ましい態様としては、三本鎖DNAを形成している標識されたオリゴヌクレオチドプローブを、その標識マーカの性質に基づいて検出を行う。例えば、オリゴヌクレオチドプローブが³²Pで標識されている場合は、相同組換えタンパク質によって形成された三本鎖DNA複合体を、除タンパク質、熱処理を施した後、反応液をゲル電気泳動し、ゲルのオートラジオグラムをとり、標識オリゴヌクレオチドからのシグナルをX線フィルム上に記録させることにより検出を行うことができる。このようにしてX線フィルム上のバンドの有無を調べることにより、熱処理後も標的二本鎖DNAと結合し、三本鎖DNAを形成しているオリゴヌクレオチドプローブを検出することができる。

【0047】

本発明の好ましい態様は、個々のヒトゲノム中に存在するSNPの検出である。まず、SNPの存在を調べたいDNA領域からなる二本鎖DNA（標的二本鎖DNA）の調製を行う。該DNAは、標的二本鎖DNAをPCRで増幅して生じるDNA断片を用いることができる。また、制限酵素認識部位を使ってゲノムDNAを切断、もしくはそのまま未処理のゲノムDNAを標的二本鎖DNAとして使用することができる。次いで標的二本鎖DNA断片の一方の鎖に相補的な塩基配列を含むオリゴヌクレオチドプローブを作製する。このときの塩基配列は、各種ヒトゲノムデータベース等によって一般的に公開されている配列データを利用することができる。上記の本発明の検出方法によって、三本鎖DNAに結合したオリゴヌクレオチドプローブの存在が検出されない場合、標的二本鎖DNAのオリゴヌクレオチドプローブと相補的であるDNA領域中に、SNPが存在する（被検多型部位に1塩基の変異が存在する）ものと判定される。一方、三本鎖DNAに結合したオリゴヌクレオチドプローブの存在が検出された場合、標的二本鎖DNAのオリゴヌクレオチドプローブと相補的であるDNA領域中には、SNPは存在しないものと判定される。

【0048】

また、予め多型部位が判明している場合は、本発明による検出方法によって、該多型部位の変異した塩基の種類を判定することが可能である。その1つの態様としては、まず、該多型部位を含む二本鎖DNA断片（標的二本鎖DNA）を調製する。次いで、標的二本鎖DNAの該多型部位を含む二本鎖DNA領域の一方の鎖に相補的な配列からなるオリゴヌクレオチドプローブを作製する。その際、被検多型部位に対応するオリゴヌクレオチド上の位置の塩基がA（アデニン）、T（チミン）、G（グアニン）またはC（シトシン）となるように、計4種のオリゴヌクレオチドプローブを作製する。本発明の方法によって、三本鎖DNAに結合するオリゴヌクレオチドプローブを検出し、そのオリゴヌクレオチドプローブの被検多型部位に対応する塩基の種類から、標的DNA中の多型部位の塩基の種類を判定することができる。例えば、被検多型部位に対応する位置にAを有するオリゴヌクレオチドプローブが上記の方法によって検出された場合、被検多型部位の塩基の種類はTであるものと判定される。

【 0 0 4 9 】

さらに本発明は、相同組換えタンパク質を利用した標的二本鎖DNA中の多型を検出するためのキットを提供する。本発明のキットは少なくとも、

（a）被検多型部位を含む二本鎖DNAにハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブ

（b）相同組換えタンパク質

の要素を含む。（a）、（b）の各要素についての詳細は既に記載した通りである。

【 0 0 5 0 】

本発明の上記キットには、他にヌクレオチド三リン酸、緩衝剤、相同組換えタンパク質を除去するための試薬を含めることができる。相同組換えタンパク質を除去するための試薬には、プロテイナーゼ等のタンパク質も包含される。

【 0 0 5 1 】

【実施例】

以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

【 0 0 5 2 】

[実施例 1] 三本鎖DNA形成における各反応成分の依存性

三本鎖DNAを形成する際の反応成分を調べる実験を行った。標的二本鎖DNAとしてM13 mp18 RF DNAを制限酵素SnaB Iで直鎖状にしたものと、その標的DNAの末端部位の配列を持つ60 merのオリゴヌクレオチド1および2を用意した。また、標的DNAとして、pBR322 DNAを制限酵素ScaIで直鎖状にしたものと、その標的DNAの末端部位の配列を持つ60merのオリゴヌクレオチド3を用意した。オリゴヌクレオチド1、2および3は図1上段で示すような配列の方向性を持つ。オリゴヌクレオチド1は、T4ポリヌクレオチドキナーゼ (Polynucleotide kinase)と $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATPを用いて、 ^{32}P で5'末端を標識した。1 pmolの標識オリゴヌクレオチド1、3.0 μg のRecAタンパク質、4.8 mM ATP- γ S、200 ngの標的DNAを、20 mM 酢酸マグネシウム、30 mM 酢酸トリス (pH 7.2) 中で、37 °Cで30分間保温した後に、0.5 % (W/Vol) SDS、0.7 mg/ml プロティナーゼKを加え、37°Cで30分間保温することにより、除タンパク質を行った。その半分量について、1%アガロースゲル電気泳動を行った。泳動後にゲルをエチジウムブロミド染色し、DNAの写真記録した。ゲルをろ紙の上に載せてゲル乾燥器で乾燥させた後、ゲルのオートラジオグラムをとり、標識オリゴヌクレオチドからのシグナルをX線フィルム上に記録した。結果を図1 (A) のレーン1に示す。使用したオリゴヌクレオチドの塩基配列は以下の通りである。

【 0 0 5 3 】

オリゴヌクレオチド1 5'- agaggctttg aggactaaag actttttcat gaggaagttt
ccattaaacg ggtaaaatac -3' / 配列番号 : 1

オリゴヌクレオチド2 5'- gtattttacc cgtttaatgg aaacttcctc atgaaaaagt ct
ttagtcct caaagcctct -3' / 配列番号 : 2

オリゴヌクレオチド3 5'- acgccgggca agagcaactc ggtcgccgca tacactattc tc
agaatgac ttggttgagt -3' / 配列番号 : 3

【 0 0 5 4 】

図1 (B) は、泳動後にゲルをエチジウムブロミド染色し、DNAの写真記録した結果を示す。

【 0 0 5 5 】

上記の結果から、三本鎖DNA形成には反応成分としてRecA、ATP- γ Sを反応に加える必要があることが示された。

【 0 0 5 6 】

〔実施例 2〕 三本鎖DNA形成に必要とされるオリゴヌクレオチド配列の方向性
三本鎖DNA形成の際に必要とされるオリゴヌクレオチドの配列の方向性を検討した。標的DNAとしてM13 mp18 RF DNAを制限酵素SnaB Iで直鎖状にしたものと、その両端の標的DNAの末端部位の配列を有する60 merのオリゴヌクレオチド1、2、4 および5を用意した。該オリゴヌクレオチドは図2上段で示すような配列の方向性を有する。反応条件は実施例1に記載した条件で行った。その結果を図2 (A) に示す。使用したオリゴヌクレオチドの塩基配列は以下の通りである。
オリゴヌクレオチド4 5'- tgttttagtg tattctttcg cctctttcgt tttaggttgg tg ccttcgta gtggcattac -3' / 配列番号: 4
オリゴヌクレオチド5 5'- gtaatgccac tacgaaggca ccaacctaaa acgaaagagg cg aaagaata cactaaaaca -3' / 配列番号: 5

【 0 0 5 7 】

図2 (B) は、泳動後にゲルをエチジウムブロミド染色し、DNAの写真を記録した結果を示す。

【 0 0 5 8 】

以上の結果から、直鎖状標的DNAの両末端部位で三本鎖DNA形成が可能であり、そのとき用いるオリゴヌクレオチドは、標的DNAの両末端配列の一方の方向性を有する配列でなければならないことが分かった。

【 0 0 5 9 】

〔実施例 3〕 三本鎖DNA形成反応に必要とされる、オリゴヌクレオチド配列の位置関係

三本鎖DNA形成反応に必要なオリゴヌクレオチド配列の位置関係についての検討を行った。標的DNAとしてM13 mp18 RF DNAを制限酵素SnaB Iで直鎖状にしたものと、その標的DNAの末端部位の配列を持つ60 merのオリゴヌクレオチド1、および該標的DNAの末端を10~40塩基残した末端部位の配列を持つオリゴヌクレオ

チドを用意した。反応条件は、実施例 1 に記載した条件で行った。結果を図 3 (A) に示す。使用したオリゴヌクレオチドの塩基配列は次の通りである。

オリゴヌクレオチド 6 5' - tccgatgctg tctttcgctg ctgagggtga cgatcccgca aaagcggcct ttaactccct -3' / 配列番号 : 6

オリゴヌクレオチド 7 5' - ctaccctcgt tccgatgctg tctttcgctg ctgagggtga cgatcccgca aaagcggcct -3' / 配列番号 : 7

オリゴヌクレオチド 8 5' - gtagccgttg ctaccctcgt tccgatgctg tctttcgctg ctgagggtga cgatcccgca -3' / 配列番号 : 8

【 0 0 6 0 】

図 3 (B) は、泳動後にゲルをエチジウムブロミド染色し、DNA の写真を記録した結果を示す。

【 0 0 6 1 】

以上の結果から、三本鎖 DNA 形成に必要なオリゴヌクレオチド配列は、標的 DNA 末端から 20 ベース以内 DNA 鎖の内部に入った配列からはじまる標的 DNA の配列を持つものが好ましいことが示唆された。

【 0 0 6 2 】

[実施例 4] 三本鎖 DNA 形成反応に必要なオリゴヌクレオチドの長さ
三本鎖 DNA 形成反応に必要なオリゴヌクレオチド配列の長さを調べる実験を行った。標的 DNA として M13 mp18 RF DNA を制限酵素 SnaB I で直鎖状にしたものと、その標的 DNA の末端部位の配列を持つ 80 ~ 20 mer のオリゴヌクレオチドを用意した。反応条件は、実施例 1 に記載した条件で行った。結果を図 4 (A) に示す。使用したオリゴヌクレオチドの塩基配列は以下の通りである。

【 0 0 6 3 】

オリゴヌクレオチド 9 5' - caaagcctct gtagccgttg ctaccctcgt tccgatgctg tctttcgctg ctgagggtga -3' / 配列番号 : 9

オリゴヌクレオチド 10 5' - ctttagtcct caaagcctct gtagccgttg ctaccctcgt tccgatgctg tctttcgctg -3' / 配列番号 : 10

オリゴヌクレオチド 11 5' - ctaccctcgt tccgatgctg tctttcgctg ctgagggtga cgatcccgca aaagcggcct ttaactccct gcaagcctca -3' / 配列番号 : 11

オリゴヌクレオチド 1 2 5' - ctgagggtga cgatcccgca aaagcggcct ttaactccct
gcaagcctca -3' / 配列番号 : 1 2

オリゴヌクレオチド 1 3 5' - cgatcccgca aaagcggcct ttaactccct gcaagcctca
-3' / 配列番号 : 1 3

【 0 0 6 4 】

図 4 (B) は、泳動後にゲルをエチジウムブロミド染色し、DNAの写真を記録した結果を示す。

【 0 0 6 5 】

以上の結果から、三本鎖DNA形成に必要なオリゴヌクレオチドの長さは、好ましくは40 mer以上が必要であることが分かった。

【 0 0 6 6 】

[実施例 5] 三本鎖DNAの熱安定性

三本鎖DNAの熱安定性について検討した。標的DNAとしてM13 mp18RF DNAを制限酵素SnaB Iで直鎖状にしたものと、その標的DNAの末端部位の配列を持つ60 merのオリゴヌクレオチド 1 を用意した。オリゴヌクレオチドは、³²Pで5'末端を標識した。1 pmolの標識オリゴヌクレオチド 1、200 ngの標的DNA、3.0 μgのRecAタンパク質、4.8 mM ATP-γS、30mM 酢酸トリス (pH7.2)、20 mM 酢酸マグネシウムが含まれる。反応液を37 °Cで30分間保温した後に、0.5 % (W/Vol) SDS、0.7 mg/ml プロテイナーゼKを加え、37°Cで30分間保温した。フェノール・クロロフォルム抽出を1回行った後、S-400スピнкаラム (アマシャムファルマシアバイオテク社製) の操作を2回行い、未反応のオリゴヌクレオチドの除去を行った。この全量について、25°Cで10分間熱処理を行った後、半分量を1 %アガロースゲル電気泳動を行った。泳動後に、エチジウムブロミド染色を行いゲルの写真を記録した後、ゲルをろ紙の上に載せてゲル乾燥器で乾燥させた。シグナルの検出は、乾燥させたゲルのオートラジオグラムをとり、X線フィルム上に記録した。その結果を図 6 (A) のレーン 1 に示す。

【 0 0 6 7 】

図 6 (B) は、泳動後にゲルをエチジウムブロミド染色し、DNAの写真を記録した結果を示す。また、レーン 1 からレーン 2 3 の、標識オリゴヌクレオチドか

らのシグナル強度を、BAS2000 Image analyzerで測定し、その結果を図7に示す。

【 0 0 6 8 】

上記の結果から60 merのオリゴヌクレオチドを用いた三本鎖の熱安定性は、70℃付近であるのに対し、ミスマッチが入ったオリゴヌクレオチドでは、熱安定性が65℃付近であることが分かった。

【 0 0 6 9 】

[実施例6] 1塩基変異の種類による影響

オリゴヌクレオチド中の1塩基変異の種類によって、三本鎖DNA形成に及ぼされる影響を調べた。オリゴヌクレオチド3を用いたことと、標的DNAとしてPCR Product (a)を用いたこと以外は、実施例5の図6 (A) のレーン1と同じ反応を行った。その実験結果を図9 (A) のレーン1に示す。PCR Product (a)を調製するためのPCR反応は、プライマーはpBR322 DNAを制限酵素Sca Iで切断したときにできる末端と同じ配列をもつ35-merのプライマー1と、もう一方のDNA末端の配列をもつ35-merのプライマー2を用いて、1ngのpBR322 DNAを鋳型として、27cycle (98℃-20秒、68℃-5分) で常法に従って行った。PCR産物の一部は、1%アガロースゲル電気泳動を行い、QIAGEN Gel Extraction Kitを用いて、PCR Product (a)を抽出し、その常法により精製を行った。

【 0 0 7 0 】

図9 (B) は、泳動後にゲルをエチジウムブロミド染色し、DNAの写真を記録した結果を示す。使用したオリゴヌクレオチドの塩基配列は以下の通りである。

【 0 0 7 1 】

オリゴヌクレオチド14 5'- aaagcggcct ttaactccct gcaagcctca -3' / 配列番号: 14

オリゴヌクレオチド15 5'- ttaactccct gcaagcctca -3' / 配列番号: 15

オリゴヌクレオチド16 5'- agaggctttg aggactaaag actttttcat Caggaagt tt ccattaaacg ggtaaaatac -3' / 配列番号: 16

オリゴヌクレオチド17 5'- acgccgggca agagcaactc ggtcgccgca Gacactattc tcagaatgac ttggttgagt -3' / 配列番号: 17

オリゴヌクレオチド 1 8 5'- acgccgggca agagcaactc ggtcgccgca Aacactattc
tcagaatgac ttggttgagt -3' / 配列番号 : 1 8

オリゴヌクレオチド 1 9 5'- acgccgggca agagcaactc ggtcgccgca Caaactattc
tcagaatgac ttggttgagt -3' / 配列番号 : 1 9

オリゴヌクレオチド 2 0 5'- tgcgggatcg tcaccctcag cagcgaaaga cagcatcgga
acgagggttag caacggctac agaggctttg aggactaaag actttttcat gaggaagttt ccatta
aacg ggtaaaatac -3' / 配列番号 : 2 0

オリゴヌクレオチド 2 1 5'- Ggcgggatcg tcaccctcag cagcgaaaga cagcatcgga
acgagggttag caacggctac agaggctttg aggactaaag actttttcat gaggaagttt ccatta
aacg ggtaaaatac -3' / 配列番号 : 2 1

オリゴヌクレオチド 2 2 5'- tgcgggatcg tcacGctcag cagcgaaaga cagcatcgga
acgagggttag caacggctac agaggctttg aggactaaag actttttcat gaggaagttt ccatta
aacg ggtaaaatac -3' / 配列番号 : 2 2

【 0 0 7 2 】

【実施例 7】 オリゴヌクレオチド中の 1 塩基変異の位置による検出感度の影響
オリゴヌクレオチド中の標的 DNA に対する 1 塩基変異の位置による、SNP の検出
感度に及ぼす影響を調べた。標的 DNA として M13 mp18 RF DNA を制限酵素 SnaBI で
直鎖状にしたものと、その標的 DNA の末端部位の配列を有し、標的 DNA と 1 塩基が
置換されたオリゴヌクレオチドを用意した。オリゴヌクレオチド中の 1 塩基置換
の位置による検出感度の影響を検討した。反応条件は、実施例 1 に記載した条件
で行った。結果を図 1 0 に示す。

【 0 0 7 3 】

また、使用したオリゴヌクレオチドの塩基配列は以下の通りである。

オリゴヌクレオチド 2 3 5'- tgcgggatcg tcaccctcag cagcgGaaga cagcatcgga
acgagggttag caacggctac agaggctttg aggactaaag actttttcat gaggaagttt ccatta
aacg ggtaaaatac -3' / 配列番号 : 2 3

オリゴヌクレオチド 2 4 5'- tgcgggatcg tcaccctcag cagcgaaaga cagGtcgga
acgagggttag caacggctac agaggctttg aggactaaag actttttcat gaggaagttt ccatta
aacg ggtaaaatac -3' / 配列番号 : 2 4

オリゴヌクレオチド 2 5 5'- tgcgggatcg tcaccctcag cagcgaaaga cagcatcgga
acgagggttag Gaacggctac agaggctttg aggactaaag actttttcat gaggaagttt ccatta
aacg ggtaaaatac -3' / 配列番号 : 2 5

オリゴヌクレオチド 2 6 5'- tgcgggatcg tcaccctcag cagcgaaaga cagcatcgga
acgagggttag caacggctac agaggctGtg aggactaaag actttttcat gaggaagttt ccattaa
acg ggtaaaatac -3' / 配列番号 : 2 6

オリゴヌクレオチド 2 7 5'- tgcgggatcg tcaccctcag cagcgaaaga cagcatcgga
acgagggttag caacggctac agaggctttg aggactaaag actttGtcat gaggaagttt ccatta
aacg ggtaaaatac -3' / 配列番号 : 2 7

オリゴヌクレオチド 2 8 5'- tgcgggatcg tcaccctcag cagcgaaaga cagcatcgga
acgagggttag caacggctac agaggctttg aggactaaag actttttcat gaggaGgttt ccatta
aacg ggtaaaatac -3' / 配列番号 : 2 8

オリゴヌクレオチド 2 9 5'- tgcgggatcg tcaccctcag cagcgaaaga cagcatcgga
acgagggttag caacggctac agaggctttg aggactaaag actttttcat gaggaagttt ccattG
aacg ggtaaaatac -3' / 配列番号 : 2 9

【 0 0 7 4 】

以上の結果から、変異が入っている箇所がオリゴヌクレオチドの端にある場合でもSNPの検出が可能であることが分かった。

【 0 0 7 5 】

さらに、下記で示すオリゴヌクレオチドを使用して同様の実験を行った。

オリゴヌクレオチド 1 5'- agaggctttg aggactaaag actttttcat gaggaagttt
ccattaaacg ggtaaaatac -3' / 配列番号 : 1

オリゴヌクレオチド 3 0 5'- Cgaggctttg aggactaaag actttttcat gaggaagt
tt ccattaaacg ggtaaaatac -3' / 配列番号 : 3 0

オリゴヌクレオチド 3 1 5'- agaggctttg Cggactaaag actttttcat gaggaagt
tt ccattaaacg ggtaaaatac -3' / 配列番号 : 3 1

オリゴヌクレオチド 3 2 5'- agaggctttg aggactaaag Cctttttcat gaggaagt
tt ccattaaacg ggtaaaatac -3' / 配列番号 : 3 2

オリゴヌクレオチド 1 6 5'- agaggctttg aggactaaag actttttcat Caggaagt

tt ccattaaacg ggtaaaatac -3' / 配列番号 : 1 6

オリゴヌクレオチド 3 3 5' - agaggctttg aggactaaag actttttcat gaggaagt

tC ccattaaacg ggtaaaatac -3' / 配列番号 : 3 3

オリゴヌクレオチド 3 4 5' - agaggctttg aggactaaag actttttcat gaggaagt

tt ccattaaacC ggtaaaatac -3' / 配列番号 : 3 4

オリゴヌクレオチド 3 5 5' - agaggctttg aggactaaag actttttcat gaggaagt

tt ccattaaacg ggtaaaatCc -3' / 配列番号 : 3 5

【 0 0 7 6 】

結果を図 1 2 に示す。変異の位置および種類に関わらず SNP の検出が可能であることが分かった。

【 0 0 7 7 】

[実施例 8] 塩基の欠失、挿入の検出

標的 DNA として M13 mp18RF DNA を制限酵素 SnaB I で直鎖状にしたものと、該標的 DNA の末端部位の配列を持つ 60 mer のオリゴヌクレオチド 1 を用意した。オリゴヌクレオチドは、³²P で 5' 末端を標識した。1 pmol の標識オリゴヌクレオチド 1、200 ng のターゲット DNA、3.0 μg の RecA タンパク質、4.8 mM ATP-γ S、30 mM 酢酸トリス (pH7.2)、20 mM 酢酸マグネシウムが含まれる。反応液を 37 °C で 30 分間保温した後に、0.5 % (W/Vol) SDS、0.7 mg/ml プロテイナーゼ K を加え、37 °C で 30 分間保温した。フェノール・クロロフォルム抽出を 1 回行った後、S-400 スピнкаラム (アマシャムファルマシアバイオテク社製) の操作を 2 回行い、未反応のオリゴヌクレオチドの除去を行った。この全量について、25 °C で 10 分間の熱処理を行った後、半分量を 1% アガロースゲル電気泳動を行った。泳動後に、エチジウムブロミド染色を行いゲルの写真を記録した後、ゲルをろ紙の上に載せてゲル乾燥器で乾燥させた。シグナルの検出は、乾燥させたゲルのオートラジオグラムをとり、X 線フィルム上に記録した。その結果を図 1 3 (A) のレーン 1 に示す。

【 0 0 7 8 】

また、使用したオリゴヌクレオチドの塩基配列は以下の通りである。

オリゴヌクレオチド 3 6 5' - agaggctttg aggactaaag actttttcat gCaggaag

ttt ccattaaacg ggtaaaatac -3' / 配列番号 : 3 6

オリゴヌクレオチド 3 7 5' - agaggctttg aggactaaag actttttcat aggaagtt

t ccattaaacg ggtaaaatac -3' / 配列番号 : 3 7

【 0 0 7 9 】

以上の結果から、変異が挿入または欠失であってもSNPの検出が可能であることが分かった。

【 0 0 8 0 】

【発明の効果】

本発明によって、相同組換えタンパク質を利用した標的DNA配列中の多型を検出する方法が提供された。本発明の方法は、標的DNAと多型検出のためのオリゴヌクレオチドプローブが相同組換えタンパク質により三本鎖DNA構造体を形成する。この三本鎖DNAは、少なくとも40bp程度の長さのDNAによって形成することが可能であることから、DNA多型を探索するための長いDNA領域を必要としない。また、相同組換えタンパク質による三本鎖DNA形成を介したプローブの標的DNAへの結合は、一般的なハイブリダイゼーションでみられるプローブの標的DNAへの結合よりも特異性が高いことから、従来の一般的なハイブリダイゼーションを利用したDNA多型検出法と比べて、より高感度に多型を検出することが可能となった。

【 0 0 8 1 】

本発明により、DNA多型に起因したヒト疾患の原因遺伝子の探索、疾患感受性の判定、および医薬品開発等への応用が非常に期待される。

【 0 0 8 2 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> AISIN COSMOS R&D CO., LTD.

Kazusa DNA Research Institute

<120> Method for detecting DNA polymorphism using
three-stranded DNA formation technique.

<130> AIC-101

<140>

<141>

<160> 37

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Oligonucleotide Sequence

<400> 1

agaggctttg aggactaaag actttttcat gaggaagttt ccattaaacg ggtaaaatac 60

<210> 2

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Oligonucleotide Sequence

<400> 2

gtattttacc cgtttaatgg aaacttcctc atgaaaaagt ctttagtcct caaagcctct 60

<210> 3

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Oligonucleotide Sequence

<400> 3

acgccgggca agagcaactc ggtcgccgca tacactattc tcagaatgac ttggttgagt 60

<210> 4

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Oligonucleotide Sequence

<400> 4

tgtttttagtg tattcttttcg cctcttttcgt tttaggttgg tgccttcgta gtggcattac 60

<210> 5

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Oligonucleotide Sequence

<400> 5

gtaatgccac tacgaaggca ccaacctaaa acgaaagagg cgaaagaata cactaaaaca 60

<210> 6

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Oligonucleotide Sequence

<400> 6

tccgatgctg tctttcgctg ctgagggtga cgatcccgca aaagcggcct ttaactccct 60

<210> 7

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Oligonucleotide Sequence

<400> 7

ctaccctcgt tccgatgctg tctttcgctg ctgagggtga cgatcccgca aaagcggcct 60

<210> 8

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Oligonucleotide Sequence

<400> 8

gtagccgttg ctaccctcgt tccgatgctg tctttcgctg ctgagggtga cgatcccgca 60

<210> 9

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Oligonucleotide Sequence

<400> 9

caaagcctct gtagccgttg ctaccctcgt tccgatgctg tctttcgctg ctgagggtga 60

<210> 10

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Oligonucleotide Sequence

<400> 10

cttttagtcct caaagcctct gtagccgttg ctaccctcgt tccgatgctg tctttcgctg 60

<210> 11

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Oligonucleotide Sequence

<400> 11

ctaccctcgt tccgatgctg tctttcgctg ctgagggtga cgatcccgca aaagcggcct 60
ttaactccct gcaagcctca 80

<210> 12

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Oligonucleotide Sequence

<400> 12

ctgagggtga cgatcccgca aaagcggcct ttaactccct gcaagcctca 50

<210> 13

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Oligonucleotide Sequence

<400> 13

cgatcccgca aaagcggcct ttaactccct gcaagcctca 40

<210> 14

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Oligonucleotide Sequence

<400> 14

aaagcggcct ttaactccct gcaagcctca

30

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Oligonucleotide Sequence

<400> 15

ttaactccct gcaagcctca

20

<210> 16

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Oligonucleotide Sequence

<400> 16

agaggctttg aggactaaag actttttcat caggaagttt ccattaaacg ggtaaaatac 60

<210> 17

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Oligonucleotide Sequence

<400> 17

acgccgggca agagcaactc ggtcgccgca gacactattc tcagaatgac ttggttgagt 60

<210> 18

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Oligonucleotide Sequence

<400> 18

acgccgggca agagcaactc ggtcgccgca aacactattc tcagaatgac ttggttgagt 60

<210> 19

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Oligonucleotide Sequence

<400> 19

acgccgggca agagcaactc ggtcgccgca cacactattc tcagaatgac ttggttgagt 60

<210> 20

<211> 120

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Oligonucleotide Sequence

<400> 20

tgcgggatcg tcaccctcag cagcgaaaga cagcatcgga acgagggtag caacggctac 60
agaggctttg aggactaaag actttttcat gaggaagttt ccattaaacg ggtaaaatac 120

<210> 21

<211> 120

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Oligonucleotide Sequence

<400> 21

ggcgggatcg tcaccctcag cagcgaaaga cagcatcgga acgagggtag caacggctac 60
agaggctttg aggactaaag actttttcat gaggaagttt ccattaaacg ggtaaaatac 120

<210> 22

<211> 120

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Oligonucleotide Sequence

<400> 22

tgcgggatcg tcacgctcag cagcgaaaga cagcatcgga acgagggtag caacggctac 60
agaggctttg aggactaaag actttttcat gaggaagttt ccattaaacg ggtaaaatac 120

<210> 23

<211> 120

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Oligonucleotide Sequence

<400> 23

tgcgggatcg tcaccctcag cagcggaaga cagcatcgga acgagggtag caacggctac 60
agaggctttg aggactaaag actttttcat gaggaagttt ccattaaacg ggtaaaatac 120

<210> 24

<211> 120

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Oligonucleotide Sequence

<400> 24

tgcgggatcg tcaccctcag cagcgaaaga cagcgtcgga acgagggtag caacggctac 60
agaggctttg aggactaaag actttttcat gaggaagttt ccattaaacg ggtaaaatac 120

<210> 25

<211> 120

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Oligonucleotide Sequence

<400> 25

tgcgggatcg tcaccctcag cagcgaaaga cagcatcgga acgagggtag gaacggctac 60
agaggctttg aggactaaag actttttcat gaggaagttt ccattaaacg ggtaaaatac 120

<210> 26

<211> 119

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Oligonucleotide Sequence

<400> 26

tgcgggatcg tcaccctcag cagcgaaaga cagcatcgga acgagggtag caacgggtaca 60
gaggctgtga ggactaaaga ctttttcatg aggaagtttc cattaaacgg gtaaaatac 119

<210> 27

<211> 120

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Oligonucleotide Sequence

<400> 27

tgcgggatcg tcaccctcag cagcgaaaga cagcatcgga acgagggtag caacgggtac 60
agaggctttg aggactaaag actttgtcat gaggaagttt ccattaaacg ggtaaaatac 120

<210> 28

<211> 120

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Oligonucleotide Sequence

<400> 28

tgcgggatcg tcaccctcag cagcgaaaga cagcatcgga acgagggtag caacggctac 60
agaggctttg aggactaaag actttttcat gaggaggttt ccattaaacg ggtaaaatac 120

<210> 29

<211> 120

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Oligonucleotide Sequence

<400> 29

tgcgggatcg tcaccctcag cagcgaaaga cagcatcgga acgagggtag caacggctac 60
agaggctttg aggactaaag actttttcat gaggaagttt ccattgaacg ggtaaaatac 120

<210> 30

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Oligonucleotide Sequence

<400> 30

cgaggctttg aggactaaag actttttcat gaggaagttt ccattaaacg ggtaaaatac 60

<210> 31

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Oligonucleotide Sequence

<400> 31

agaggctttg cggactaaag actttttcat gaggaagttt ccattaaacg ggtaaaatac 60

<210> 32

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Oligonucleotide Sequence

<400> 32

agaggctttg aggactaaag cctttttcat gaggaagttt ccattaaacg ggtaaaatac 60

<210> 33

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Oligonucleotide Sequence

<400> 33

agaggctttg aggactaaag actttttcat gaggaagttc ccattaaacg ggtaaaatac 60

<210> 34

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Oligonucleotide Sequence

<400> 34

agaggctttg aggactaaag actttttcat gaggaagttt ccattaaacc ggtaaaatac 60

<210> 35

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Oligonucleotide Sequence

<400> 35

agaggctttg aggactaaag actttttcat gaggaagttt ccattaaacg ggtaaaatcc 60

<210> 36

<211> 61

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Oligonucleotide Sequence

<400> 36

agaggctttg aggactaaag actttttcat gcaggaagtt tccattaaac gggtaaaata 60

c

61

<210> 37

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Oligonucleotide Sequence

<400> 37

agaggctttg aggactaaag actttttcat aggaagtttc cattaaacgg gtaaaatac 59

【図面の簡単な説明】

【図 1】 上段は実験に使用した標的DNAと、該DNAと相補的な配列からなるオリゴヌクレオチドとの位置関係を模式的に示した図である。下段左（A）は三本鎖DNA構造体をゲル電気泳動した後、標的DNAと結合した標識オリゴヌクレオチドのシグナルを検出した際の写真である。下段右（B）は、電気泳動後にゲルをエチジウムブロミド染色した際の写真である。各レーンは以下の通りである。

レーンM： DNAサイズマーカー（図面の左端にそのサイズを示す。このサイズマーカーは、 λ DNAを制限酵素Hind IIIで切断し、T4 Polynucleotide kinaseと[γ - 32 P] ATPを用いて、 32 Pで5'末端標識したものである。）。

レーン 1： 32 P標識オリゴヌクレオチド 1 を用い、RecAおよびATP- γ Sを加えて反応を行った。

レーン 2： RecAを加えないで反応を行った以外は、レーン 1 と同じ。

レーン 3： ATP- γ Sを加えないで反応を行った以外は、レーン 1 と同じ。

レーン 4： RecAとATP- γ Sを加えないで反応を行った以外はレーン 1 と同じ。

レーン 5： 32 P標識オリゴヌクレオチド 2 を用いて反応を行った以外はレーン 1 と同じ。

レーン 6： 32 P標識オリゴヌクレオチド 3 を用いて反応を行った以外はレーン 1 と同じ。

レーン 7： 標的DNAとして、pBR322 DNAを制限酵素ScaIで切断したしたものを用いたことと、 32 P標識オリゴヌクレオチド 3 を用いたこと以外は、レーン 1 と同じ。

【図 2】 上段は実験に使用した標的DNAと、該DNAと相補的な配列からなるオリゴヌクレオチドとの位置関係を模式的に示した図である。下段左（A）は三本鎖DNA構造体をゲル電気泳動した後、標的DNAと結合した標識オリゴヌクレオチ

ドのシグナルを検出した際の写真である。下段右 (B) は、電気泳動後にゲルをエチジウムブロミド染色した際の写真である。各レーンは以下の通りである。

レーン 1 : 図 1 (A) のレーン 1 と同じ反応を行ったもの。

レーン 2 : ^{32}P 標識オリゴヌクレオチド 2 を用いた以外は、レーン 1 と同じ。

レーン 3 : ^{32}P 標識オリゴヌクレオチド 4 を用いた以外は、レーン 1 と同じ。

レーン 4 : ^{32}P 標識オリゴヌクレオチド 5 を用いた以外は、レーン 1 と同じ。

【図 3】 上段は実験に使用した標的 DNA と、該 DNA と相補的な配列からなるオリゴヌクレオチドとの位置関係を模式的に示した図である。下段左 (A) は三本鎖 DNA 構造体をゲル電気泳動した後、標的 DNA と結合した標識オリゴヌクレオチドのシグナルを検出した際の写真である。下段右 (B) は、電気泳動後にゲルをエチジウムブロミド染色した際の写真である。各レーンは以下の通りである。

レーン 1 : 図 1 (A) のレーン 1 と同じ反応を行ったものである。

レーン 2 : 標的 DNA の末端 10 塩基を残した末端部位の配列をもつオリゴヌクレオチド 6 を用いた以外は、レーン 1 と同じ。

レーン 3 : 標的 DNA の末端 20 塩基を残した末端部位の配列をもつオリゴヌクレオチド 7 を用いた以外は、レーン 1 と同じ。

レーン 4 : 標的 DNA の末端 30 塩基を残した末端部位の配列をもつオリゴヌクレオチド 8 を用いた以外は、レーン 1 と同じ。

レーン 5 : 標的 DNA の末端 40 塩基を残した末端部位の配列をもつオリゴヌクレオチド 8 を用いた以外は、レーン 1 と同じ。

レーン 6 : 標的 DNA の末端 50 塩基を残した末端部位の配列をもつオリゴヌクレオチド 8 を用いた以外は、レーン 1 と同じ。

【図 4】 上段は実験に使用した標的 DNA と、該 DNA と相補的な配列からなるオリゴヌクレオチドとの位置関係を模式的に示した図である。下段左 (A) は三本鎖 DNA 構造体をゲル電気泳動した後、標的 DNA と結合した標識オリゴヌクレオチドのシグナルを検出した際の写真である。下段右 (B) は、電気泳動後にゲルをエチジウムブロミド染色した際の写真である。各レーンは以下の通りである。

レーン 1 : オリゴヌクレオチド 1 の 5' 末端部位を 20 mer 伸ばした標識オリゴヌクレオチド 1 1

を用いたこと以外は、図 1 (A) のレーン 1 と同じ反応を行った結果を示す。

レーン 2 : 図 1 (A) のレーン 1 と同じ (オリゴヌクレオチド 1 を使用)。

レーン 3 : レーン 1 で用いたオリゴヌクレオチド 1 の 5' 末端部位を 30 mer 削った標識オリゴヌクレオチド 1 2 を用いた以外は、レーン 1 と同じ。

レーン 4 : レーン 1 で用いたオリゴヌクレオチド 1 の 5' 末端部位を 40 mer 削った標識オリゴヌクレオチド 1 3 を用いた以外は、レーン 1 と同じ。

レーン 5 : レーン 1 で用いたオリゴヌクレオチド 1 の 5' 末端部位を 50 mer 削った標識オリゴヌクレオチド 1 4 を用いた以外は、レーン 1 と同じ。

レーン 6 : レーン 1 で用いたオリゴヌクレオチド 1 の 5' 末端部位を 60 mer 削った標識オリゴヌクレオチド 1 5 を用いた以外は、レーン 1 と同じ。

【図 5】 本発明の検出原理を模式的に示した図である。

【図 6】 上段は実験に使用した標的 DNA と、該 DNA と相補的な配列からなるオリゴヌクレオチドとの位置関係を模式的に示した図である。オリゴヌクレオチド上の「G」または「C」は、直ぐ上の標的 DNA の図中の文字で示した塩基対に対応する位置の塩基の種類を示す。下段左 (A) は三本鎖 DNA 構造体をゲル電気泳動した後、標的 DNA と結合した標識オリゴヌクレオチドのシグナルを検出した際の写真である。下段右 (B) は、電気泳動後に (A) に対応したゲルをエチジウムブロミド染色した際の写真である。各レーンは以下の通りである。

レーン 1 : オリゴヌクレオチド 1 を用い、熱処理 (25℃ で 10 分) を行った。

レーン 2 : 熱処理 (65℃、10 分) したこと以外は、レーン 1 と同じ。

レーン 3 : 熱処理 (70℃、10 分) したこと以外は、レーン 1 と同じ。

レーン 4 : 熱処理 (75℃、10 分) したこと以外は、レーン 1 と同じ。

レーン 5 : 熱処理 (80℃、10 分) したこと以外は、レーン 1 と同じ。

レーン 6 : 熱処理 (85℃、10 分) したこと以外は、レーン 1 と同じ。

レーン 7 : 熱処理 (90℃、10 分) したこと以外は、レーン 1 と同じ。

レーン 8 : 熱処理 (95℃、10 分) したこと以外は、レーン 1 と同じ。

レーン 9 : オリゴヌクレオチド 1 6 を用いたこと以外は、レーン 1 と同じ。

レーン 1 0 : オリゴヌクレオチド 1 6 を用いたこと以外は、レーン 2 と同じ。

レーン 1 1 : オリゴヌクレオチド 1 6 を用いたこと以外は、レーン 3 と同じ。

レーン 12 : オリゴヌクレオチド 16 を用いたこと以外は、レーン 4 と同じ。
 レーン 13 : オリゴヌクレオチド 16 を用いたこと以外は、レーン 5 と同じ。
 レーン 14 : オリゴヌクレオチド 16 を用いたこと以外は、レーン 6 と同じ。
 レーン 15 : オリゴヌクレオチド 16 を用いたこと以外は、レーン 7 と同じ。
 レーン 16 : オリゴヌクレオチド 16 を用いたこと以外は、レーン 8 と同じ。
 レーン 17 : 1 pmol の標識オリゴヌクレオチド 1、10 pmol の未標識オリゴヌクレオチド 2、100 ng の M13 mp18 ssDNA、4.8 mM ATP- γ S、30mM 酢酸トリス (pH 7.2)、20 mM 酢酸マグネシウムが含まれる反応液を 37 °C で 30 分間保温した後に、0.5 % (W/Vol) SDS、0.7 mg/ml プロティナーゼ K を加え、37°C で 30 分間保温した。その後の操作は、レーン 1 と同じ反応を行った結果を示す。
 レーン 18 : 熱処理 (65°C、10 分) したことで、レーン 17 と同じ。
 レーン 19 : 熱処理 (70°C、10 分) したことで、レーン 17 と同じ。
 レーン 20 : 熱処理 (75°C、10 分) したことで、レーン 17 と同じ。
 レーン 21 : 熱処理 (80°C、10 分) したことで、レーン 17 と同じ。
 レーン 22 : 熱処理 (85°C、10 分) したことで、レーン 17 と同じ。
 レーン 23 : 熱処理 (90°C、10 分) したことで、レーン 17 と同じ。

【図 7】 標識オリゴヌクレオチドからのシグナル強度を、BAS2000 Image analyzer で測定した結果を表す図である。縦軸は残存放射活性(%)、横軸は温度 (°C) を表す。また、三角はレーン 1 ~ 8、黒三角はレーン 9 ~ 16、丸はレーン 17 ~ 23 の結果を示す。

【図 8】 実験に使用した標的 DNA (PCR 産物) と、該 DNA と相補的な配列からなるオリゴヌクレオチドとの位置関係を模式的に示した図である。オリゴヌクレオチド上の「A」、「T」、「G」または「C」は、直ぐ上の標的 DNA の図中の文字で示した塩基対に対応する位置の塩基の種類を示す。

【図 9】 (A) は三本鎖 DNA 構造体をゲル電気泳動した後、標的 DNA と結合した標識オリゴヌクレオチドのシグナルを検出した際の写真である。下段右 (B) は、電気泳動後に (A) に対応したゲルをエチジウムブロミド染色した際の写真である。各レーンは以下の通りである。

レーン 1 : 標的 DNA として PCR 産物、およびオリゴヌクレオチド 3 を使用したこ

と以外は、図 6 レーン 1 と同じ。

レーン 2 : オリゴヌクレオチド 1 7 を用いたこと以外は、レーン 1 と同じ。

レーン 3 : オリゴヌクレオチド 1 8 を用いたこと以外は、レーン 1 と同じ。

レーン 4 : オリゴヌクレオチド 1 9 を用いたこと以外は、レーン 1 と同じ。

レーン 5 : S-400 スピнкаラムの操作により未反応のオリゴヌクレオチドを除去した後、熱処理 (70℃、10 分) したことで、レーン 1 と同じ。

レーン 6 : 熱処理 (70℃、10 分) したことで、レーン 2 と同じ。

レーン 7 : 熱処理 (70℃、10 分) したことで、レーン 3 と同じ。

レーン 8 : 熱処理 (70℃、10 分) したことで、レーン 4 と同じ。

レーン 9 : 熱処理 (80℃、10 分) したことで、レーン 1 と同じ。

レーン 1 0 : 熱処理 (80℃、10 分) したことで、レーン 2 と同じ。

レーン 1 1 : 熱処理 (80℃、10 分) したことで、レーン 3 と同じ。

レーン 1 2 : 熱処理 (80℃、10 分) したことで、レーン 4 と同じ。

レーン 1 3 : 標的 DNA としてプライマー 3 とプライマー 2 によって得られる PCR Product (b) を用いたこと以外は、レーン 1 と同じ。

レーン 1 4 : オリゴヌクレオチド 1 7 を用いたこと以外は、レーン 1 3 と同じ

レーン 1 5 : オリゴヌクレオチド 1 8 を用いたこと以外は、レーン 1 3 と同じ

レーン 1 6 : オリゴヌクレオチド 1 9 を用いたこと以外は、レーン 1 3 と同じ

レーン 1 7 : 熱処理 (70℃、10 分) したことで、レーン 1 3 と同じ。

レーン 1 8 : 熱処理 (70℃、10 分) したことで、レーン 1 4 と同じ。

レーン 1 9 : 熱処理 (70℃、10 分) したことで、レーン 1 5 と同じ。

レーン 2 0 : 熱処理 (70℃、10 分) したことで、レーン 1 6 と同じ。

レーン 2 1 : 熱処理 (80℃、10 分) したことで、レーン 1 3 と同じ。

レーン 2 2 : 熱処理 (80℃、10 分) したことで、レーン 1 4 と同じ。

レーン 2 3 : 熱処理 (80℃、10 分) したことで、レーン 1 5 と同じ。

レーン 2 4 : 熱処理 (80℃、10 分) したことで、レーン 1 6 と同じ。

レーン 2 5 : 標的DNAとしてプライマー 4 とプライマー 2 によって得られるPCR Product (c)を用いたこと以外は、レーン 1 と同じ。

レーン 2 6 : オリゴヌクレオチド 1 7 を用いたこと以外は、レーン 2 5 と同じ

。

レーン 2 7 : オリゴヌクレオチド 1 8 を用いたこと以外は、レーン 2 5 と同じ

。

レーン 2 8 : オリゴヌクレオチド 1 9 を用いたこと以外は、レーン 2 5 と同じ

。

レーン 2 9 : 熱処理 (70℃、10分) したことで、レーン 2 5 と同じ。

レーン 3 0 : 熱処理 (70℃、10分) したことで、レーン 2 6 と同じ。

レーン 3 1 : 熱処理 (70℃、10分) したことで、レーン 2 7 と同じ。

レーン 3 2 : 熱処理 (70℃、10分) したことで、レーン 2 8 と同じ。

レーン 3 3 : 熱処理 (80℃、10分) したことで、レーン 2 5 と同じ。

レーン 3 4 : 熱処理 (80℃、10分) したことで、レーン 2 6 と同じ。

レーン 3 5 : 熱処理 (80℃、10分) したことで、レーン 2 7 と同じ。

レーン 3 6 : 熱処理 (80℃、10分) したことで、レーン 2 8 と同じ。

レーン 3 7 : 標的DNAとしてプライマー 5 とプライマー 2 によって得られるPCR Product (d)を用いたこと以外は、レーン 1 と同じ。

レーン 3 8 : オリゴヌクレオチド 1 7 を用いたこと以外は、レーン 3 7 と同じ

。

レーン 3 9 : オリゴヌクレオチド 1 8 を用いたこと以外は、レーン 3 7 と同じ

。

レーン 4 0 : オリゴヌクレオチド 1 9 を用いたこと以外は、レーン 3 7 と同じ

。

レーン 4 1 : 熱処理 (70℃、10分) したことで、レーン 3 7 と同じ。

レーン 4 2 : 熱処理 (70℃、10分) したことで、レーン 3 8 と同じ。

レーン 4 3 : 熱処理 (70℃、10分) したことで、レーン 3 9 と同じ。

レーン 4 4 : 熱処理 (70℃、10分) したことで、レーン 4 0 と同じ。

レーン 4 5 : 熱処理 (80℃、10分) したことで、レーン 3 7 と同じ。

レーン 4 6 : 熱処理 (80℃、10分) したこと以外は、レーン 3 8 と同じ。

レーン 4 7 : 熱処理 (80℃、10分) したこと以外は、レーン 3 9 と同じ。

レーン 4 8 : 熱処理 (80℃、10分) したこと以外は、レーン 4 0 と同じ。

【図 1 0】 上段は実験に使用した標的DNAと、該DNAと相補的な配列からなるオリゴヌクレオチドとの位置関係を模式的に示した図である。オリゴヌクレオチド上の「G」は、変異の位置を相対的に示す。下段は三本鎖DNA構造体をゲル電気泳動した後、標的DNAと結合した標識オリゴヌクレオチドのシグナルを検出した際の写真である。各レーンは以下の通りである。

レーン 1 : オリゴヌクレオチド 2 0 を用いたこと以外は、実施例 6 の図 6 のレーン 1 と同じ反応を行った結果を示す。

レーン 2 : オリゴヌクレオチド 2 1 を用いたこと以外は、レーン 1 と同じ。

レーン 3 : オリゴヌクレオチド 2 2 を用いたこと以外は、レーン 1 と同じ。

レーン 4 : オリゴヌクレオチド 2 3 を用いたこと以外は、レーン 1 と同じ。

レーン 5 : オリゴヌクレオチド 2 4 を用いたこと以外は、レーン 1 と同じ。

レーン 6 : オリゴヌクレオチド 2 5 を用いたこと以外は、レーン 1 と同じ。

レーン 7 : オリゴヌクレオチド 2 6 を用いたこと以外は、レーン 1 と同じ。

レーン 8 : オリゴヌクレオチド 2 7 を用いたこと以外は、レーン 1 と同じ。

レーン 9 : オリゴヌクレオチド 2 8 を用いたこと以外は、レーン 1 と同じ。

レーン 1 0 : オリゴヌクレオチド 2 9 を用いたこと以外は、レーン 1 と同じ。

レーン 1 1 : 熱処理 (80℃、10分) したこと以外は、レーン 1 と同じ。

レーン 1 2 : 熱処理 (80℃、10分) したこと以外は、レーン 2 と同じ。

レーン 1 3 : 熱処理 (80℃、10分) したこと以外は、レーン 3 と同じ。

レーン 1 4 : 熱処理 (80℃、10分) したこと以外は、レーン 4 と同じ。

レーン 1 5 : 熱処理 (80℃、10分) したこと以外は、レーン 5 と同じ。

レーン 1 6 : 熱処理 (80℃、10分) したこと以外は、レーン 6 と同じ。

レーン 1 7 : 熱処理 (80℃、10分) したこと以外は、レーン 7 と同じ。

レーン 1 8 : 熱処理 (80℃、10分) したこと以外は、レーン 8 と同じ。

レーン 1 9 : 熱処理 (80℃、10分) したこと以外は、レーン 9 と同じ。

レーン 2 0 : 熱処理 (80℃、10分) したこと以外は、レーン 1 0 と同じ。

【図 1 1】 本発明の検出方法を模式的に示した図である。

【図 1 2】 上段は実験に使用した標的DNAと、該DNAと相補的な配列からなるオリゴヌクレオチドとの位置関係を模式的に示した図である。オリゴヌクレオチド上の「C」は、変異の位置を相対的に示す。中段（A）は三本鎖DNA構造体をゲル電気泳動した後、標的DNAと結合した標識オリゴヌクレオチドのシグナルを検出した際の写真である。下段（B）は、電気泳動後にゲルをエチジウムブロマイド染色した際の写真である。各レーンは以下の通りである。

- レーン 1 : 実施例 6 の図 6 のレーン 1 と同じ反応を行った結果を示す。
- レーン 2 : オリゴヌクレオチド 3 0 を用いたこと以外は、レーン 1 と同じ。
- レーン 3 : オリゴヌクレオチド 3 1 を用いたこと以外は、レーン 1 と同じ。
- レーン 4 : オリゴヌクレオチド 3 2 を用いたこと以外は、レーン 1 と同じ。
- レーン 5 : オリゴヌクレオチド 1 6 を用いたこと以外は、レーン 1 と同じ。
- レーン 6 : オリゴヌクレオチド 3 3 を用いたこと以外は、レーン 1 と同じ。
- レーン 7 : オリゴヌクレオチド 3 4 を用いたこと以外は、レーン 1 と同じ。
- レーン 8 : オリゴヌクレオチド 3 5 を用いたこと以外は、レーン 1 と同じ。
- レーン 9 : 熱処理（70℃、10分）したことで、レーン 1 と同じ。
- レーン 1 0 : 熱処理（70℃、10分）したことで、レーン 2 と同じ。
- レーン 1 1 : 熱処理（70℃、10分）したことで、レーン 3 と同じ。
- レーン 1 2 : 熱処理（70℃、10分）したことで、レーン 4 と同じ。
- レーン 1 3 : 熱処理（70℃、10分）したことで、レーン 5 と同じ。
- レーン 1 4 : 熱処理（70℃、10分）したことで、レーン 6 と同じ。
- レーン 1 5 : 熱処理（70℃、10分）したことで、レーン 7 と同じ。
- レーン 1 6 : 熱処理（70℃、10分）したことで、レーン 8 と同じ。

【図 1 3】 上段は実験に使用した標的DNAと、該DNAと相補的な配列からなるオリゴヌクレオチドとの位置関係を模式的に示した図である。中段（A）は三本鎖DNA構造体をゲル電気泳動した後、標的DNAと結合した標識オリゴヌクレオチドのシグナルを検出した際の写真である。下段（B）は、電気泳動後にゲルをエチジウムブロマイド染色した際の写真である。各レーンは以下の通りである。

- レーン 1 および 2 : 実施例 1 の図 1 のレーン 1 と同じ。

レーン3： オリゴヌクレオチド36（挿入変異を有する）を用いたこと以外はレーン1と同じ。

レーン4： オリゴヌクレオチド16（ミスマッチを有する）を用いたこと以外はレーン1と同じ。

レーン5： オリゴヌクレオチド37（欠失変異を有する）を用いたこと以外はレーン1と同じ。

レーン6： 熱処理（70℃で10分間）したこと以外はレーン1と同じ。

レーン7： 熱処理（70℃で10分間）したこと以外はレーン2と同じ。

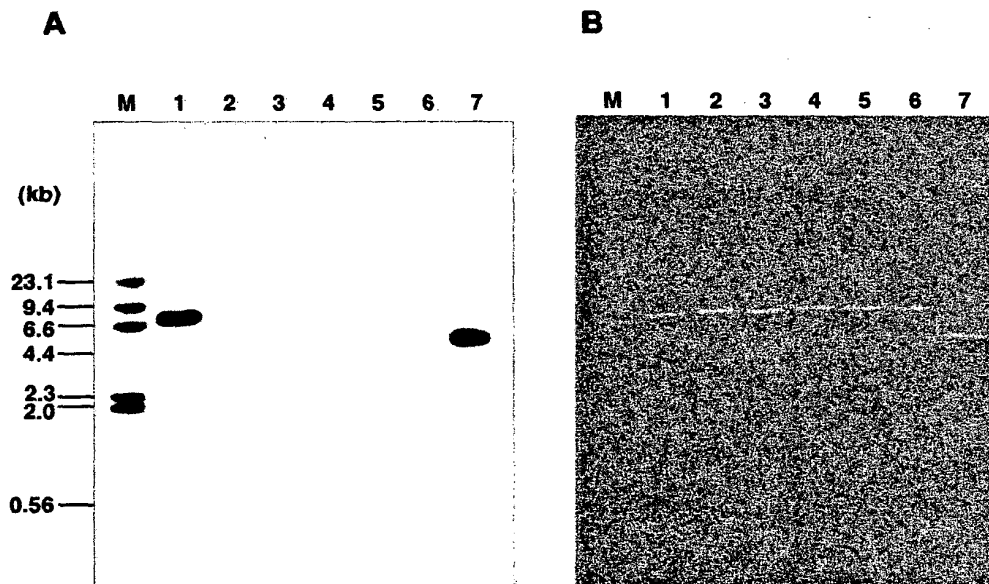
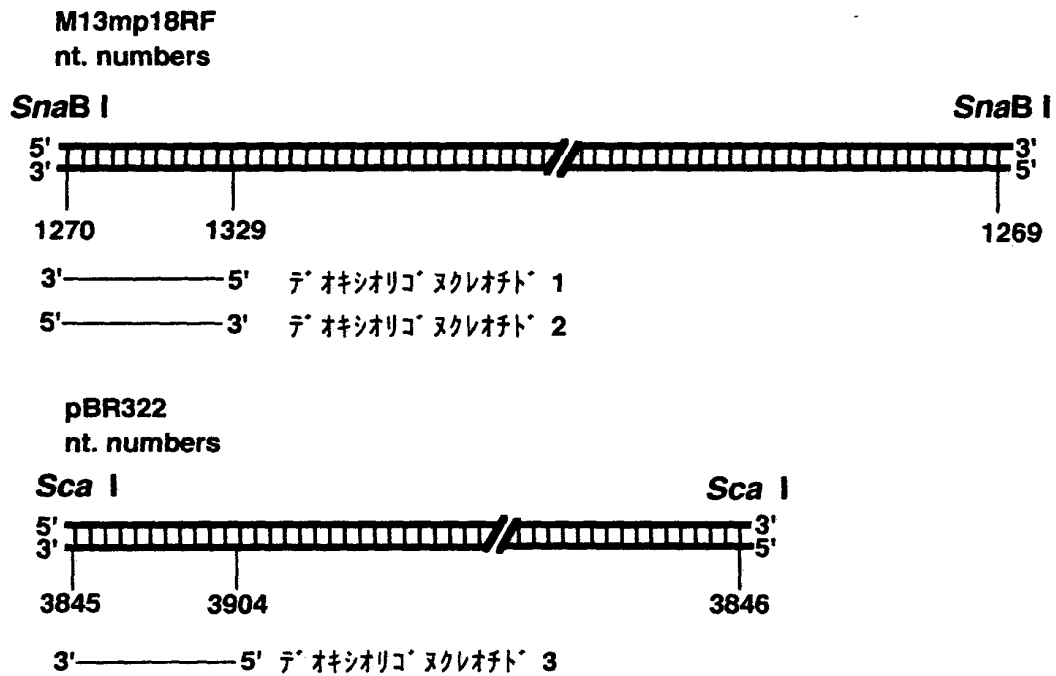
レーン8： 熱処理（70℃で10分間）したこと以外はレーン3と同じ。

レーン9： 熱処理（70℃で10分間）したこと以外はレーン4と同じ。

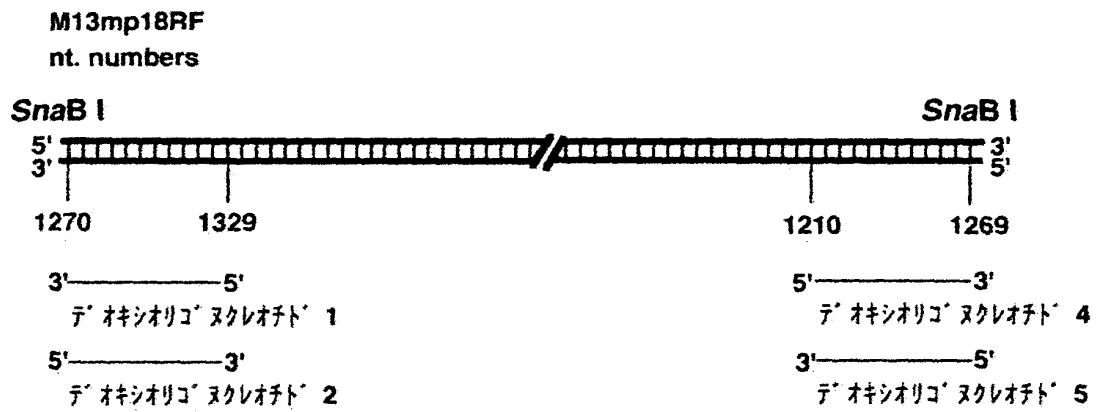
レーン10： 熱処理（70℃で10分間）したこと以外はレーン5と同じ。

【書類名】 図面

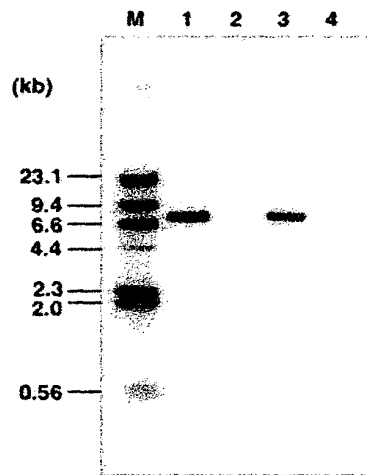
【図 1】



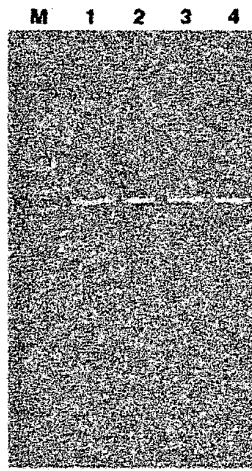
【図 2】



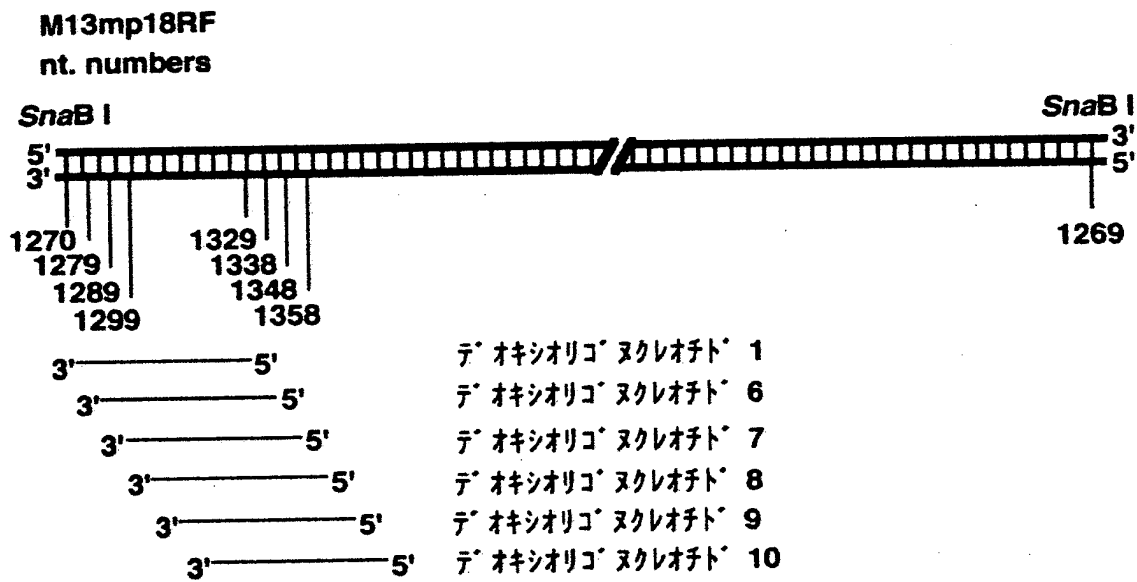
A



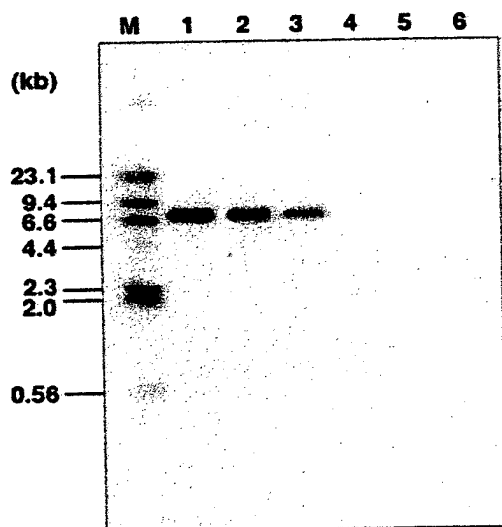
B



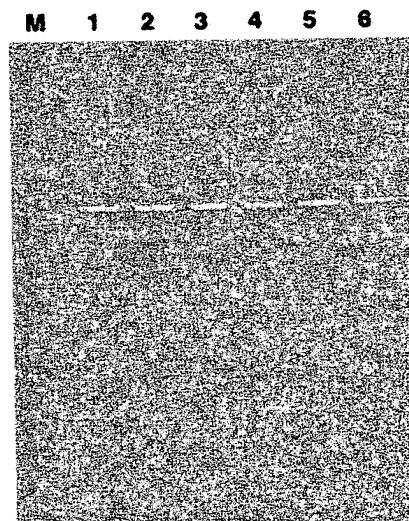
【図 3】



A

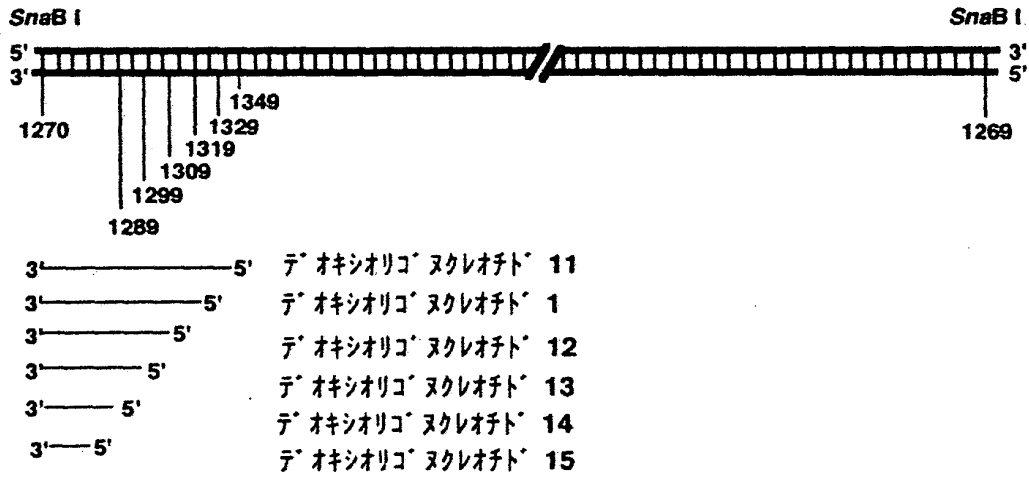


B

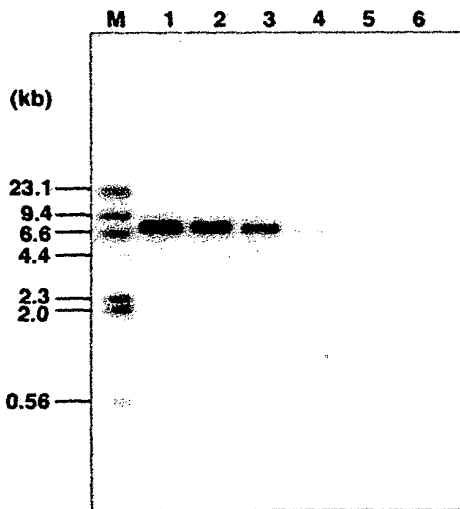


【図 4】

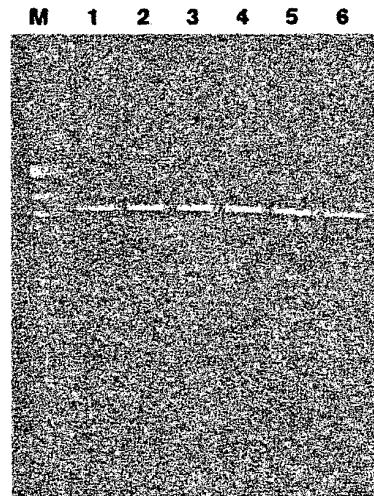
M13mp18RF mt.
numbers



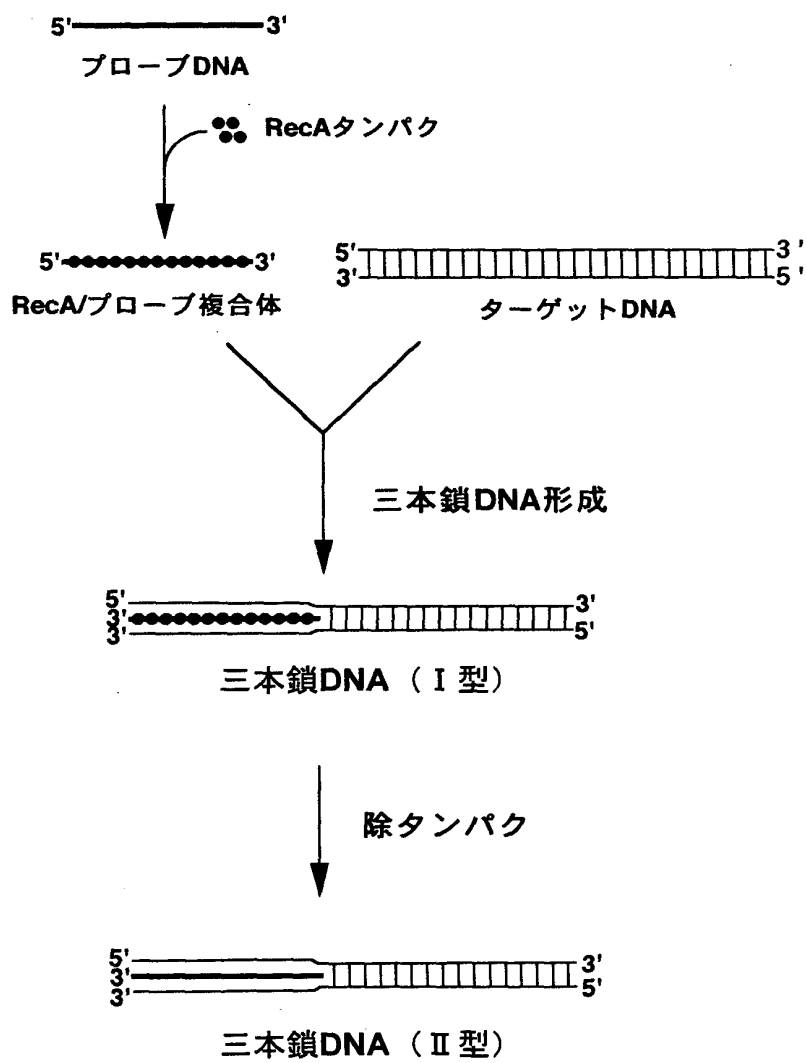
A



B

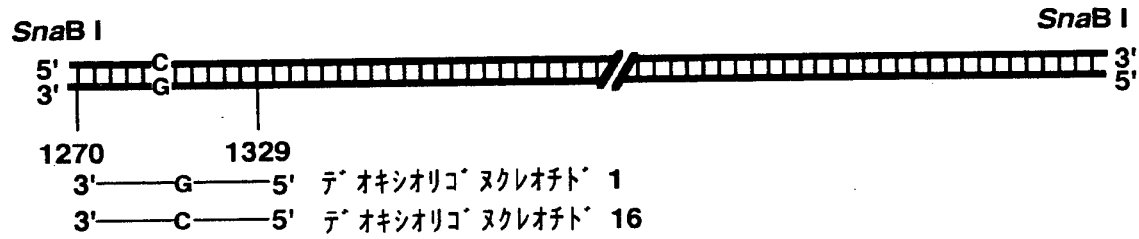


【図 5】

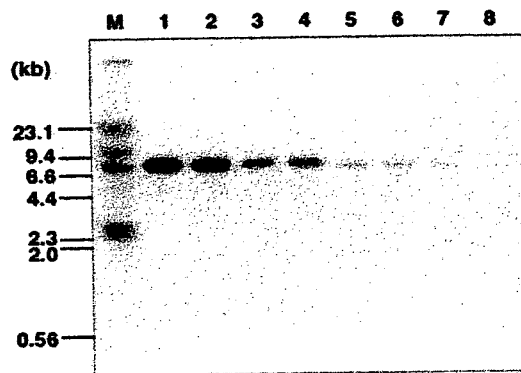


【図 6】

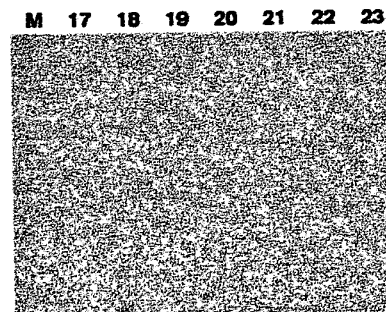
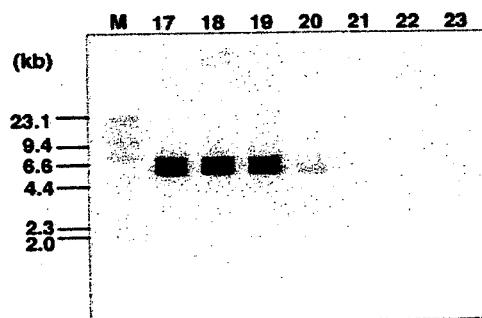
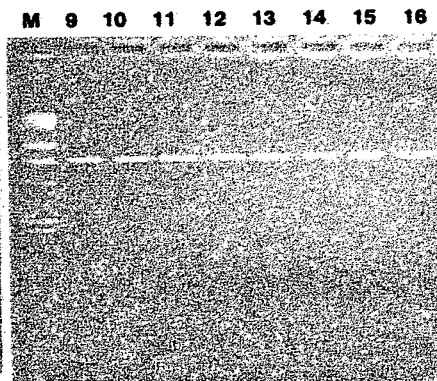
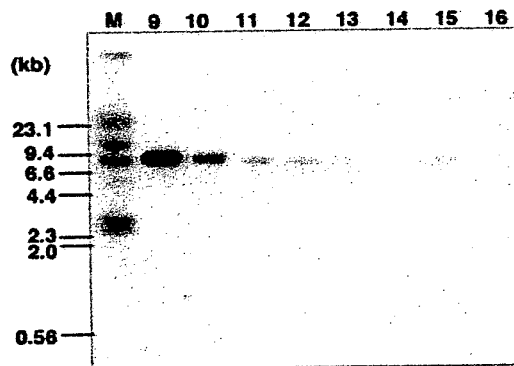
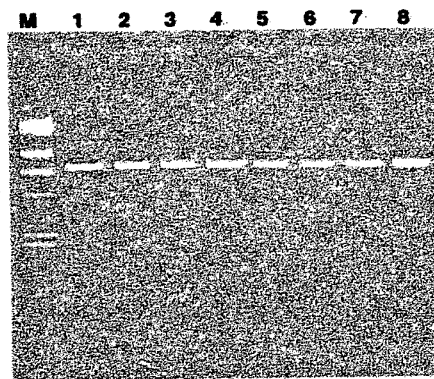
M13mp18RF
nt. numbers



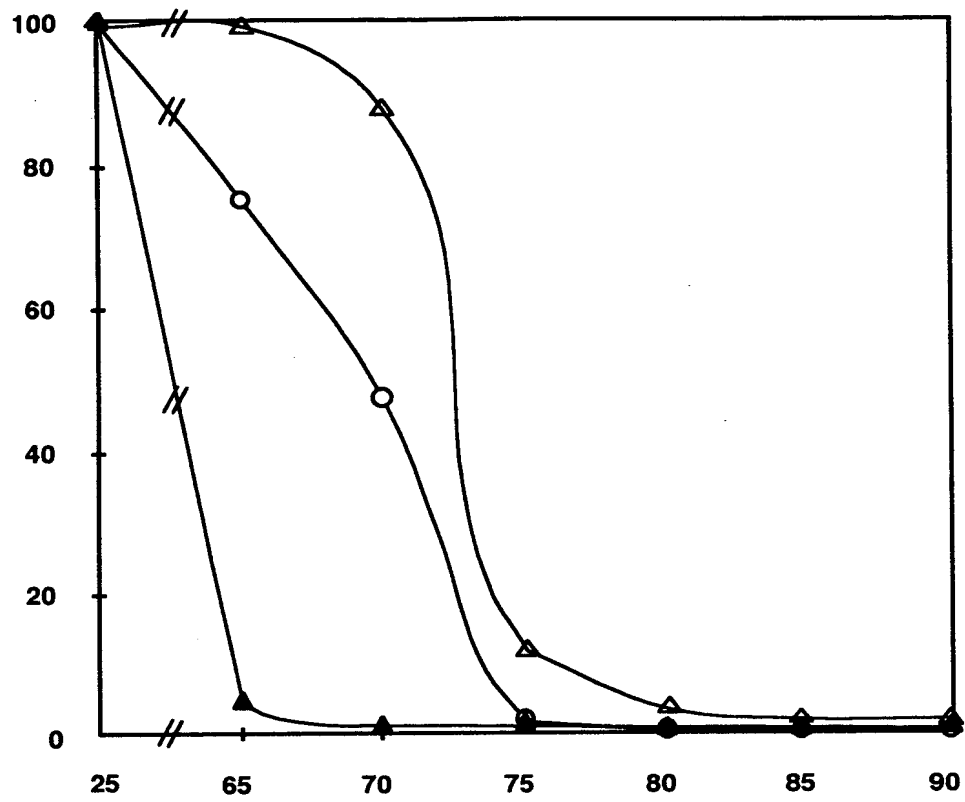
A



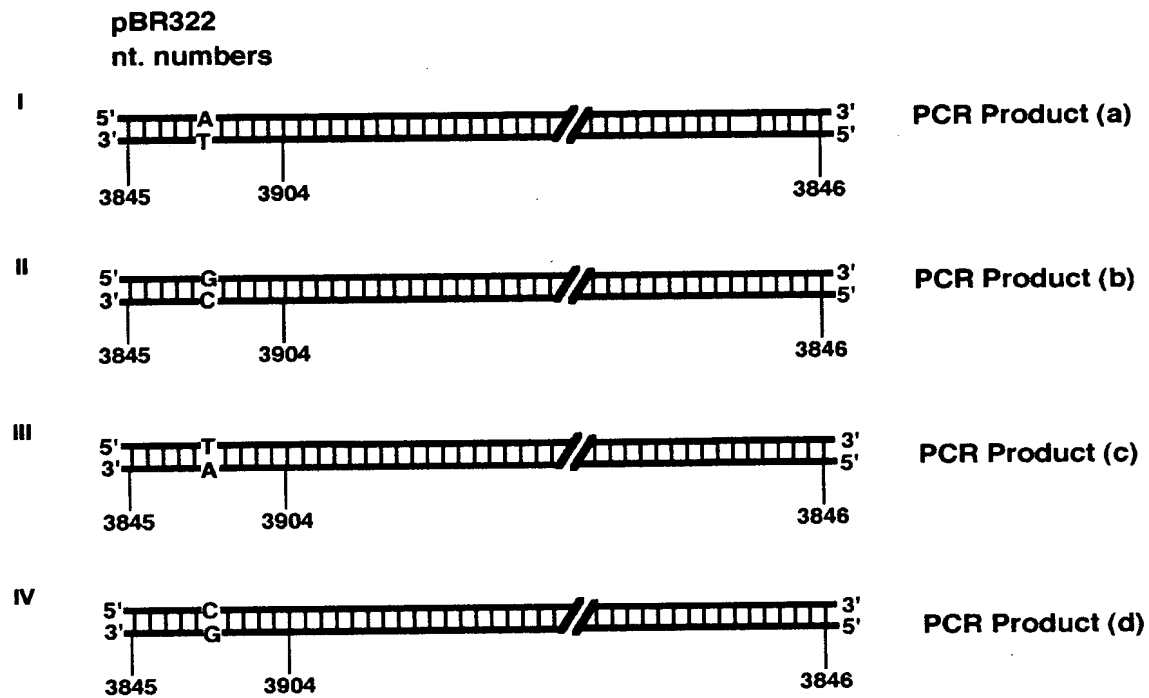
B



【図 7】



【図 8】



3'—G—5' デ オキシオリゴ ヌクレオチド 17

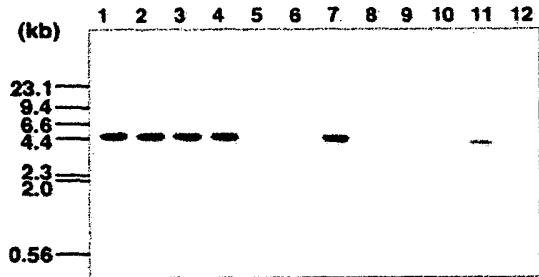
3'—A—5' デ オキシオリゴ ヌクレオチド 18

3'—T—5' デ オキシオリゴ ヌクレオチド 3

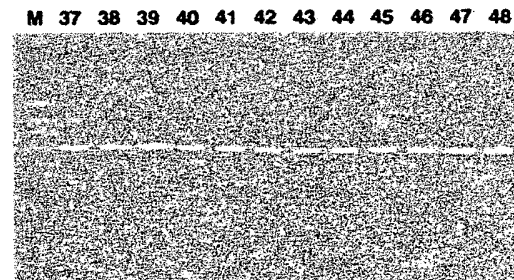
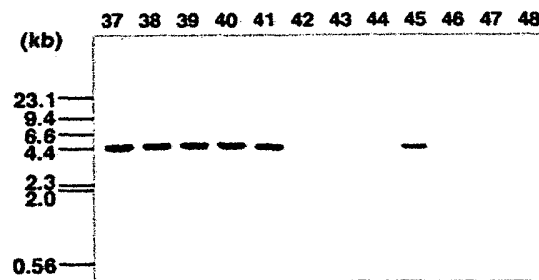
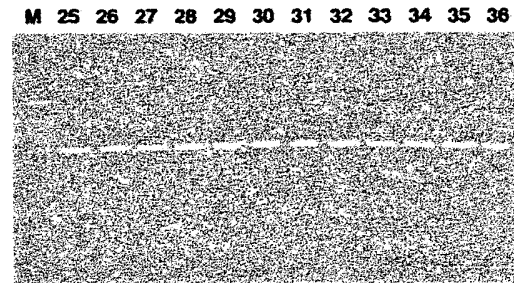
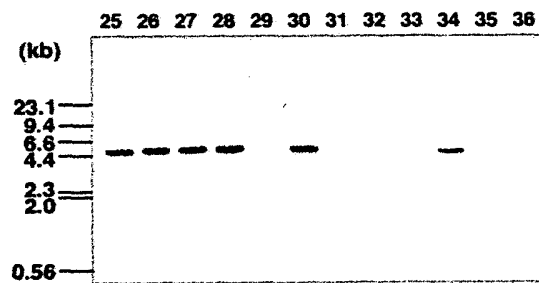
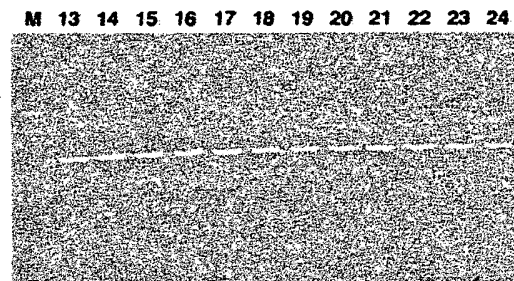
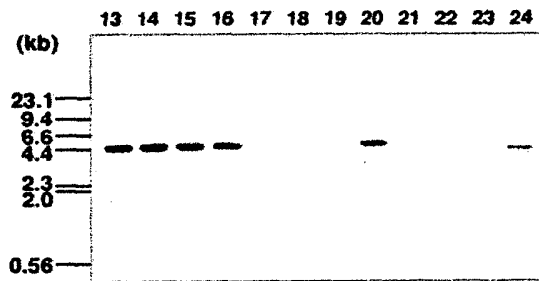
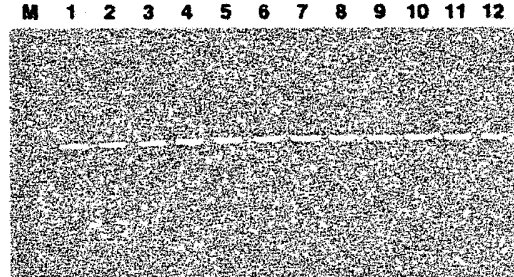
3'—C—5' デ オキシオリゴ ヌクレオチド 19

【図 9】

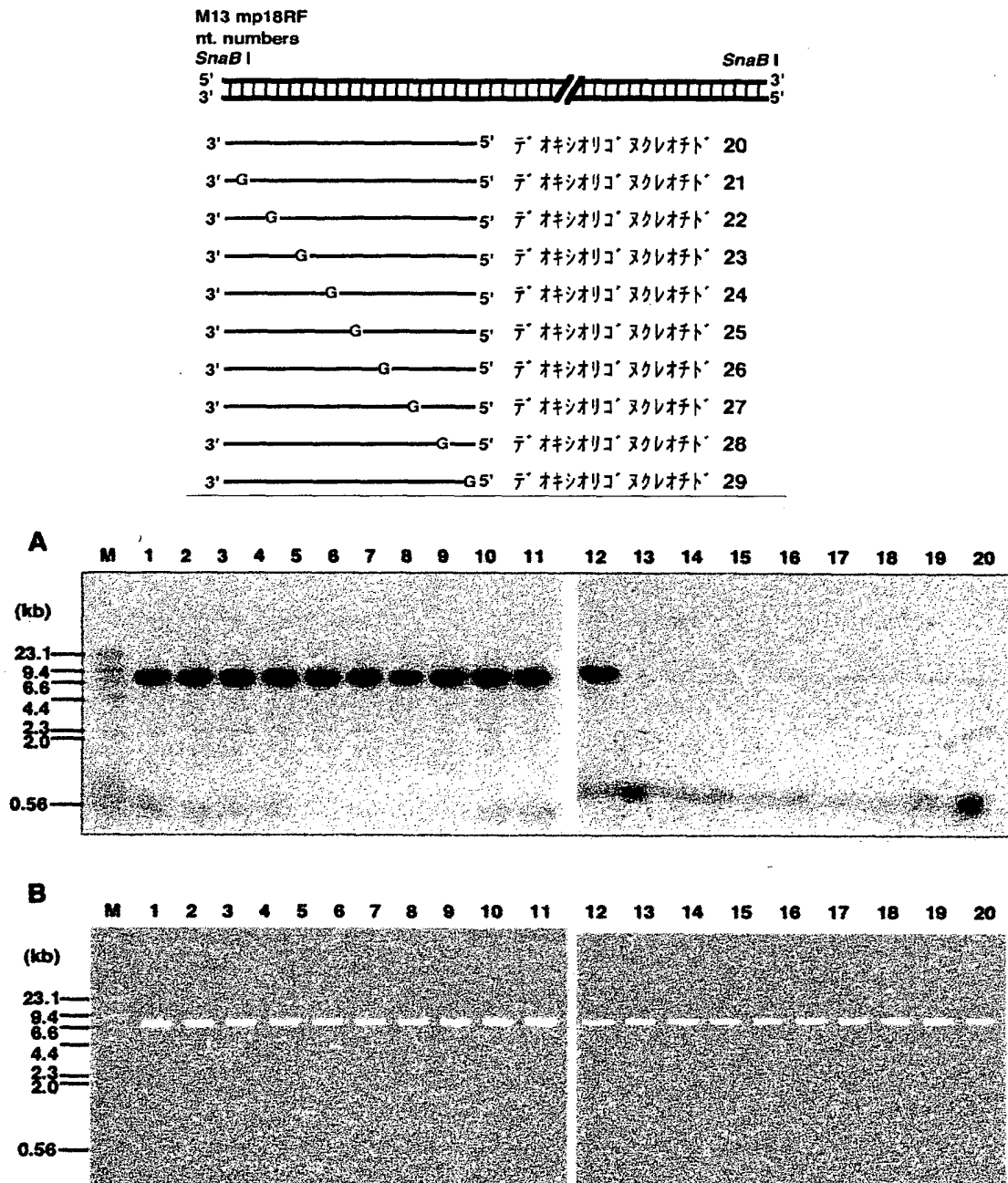
A



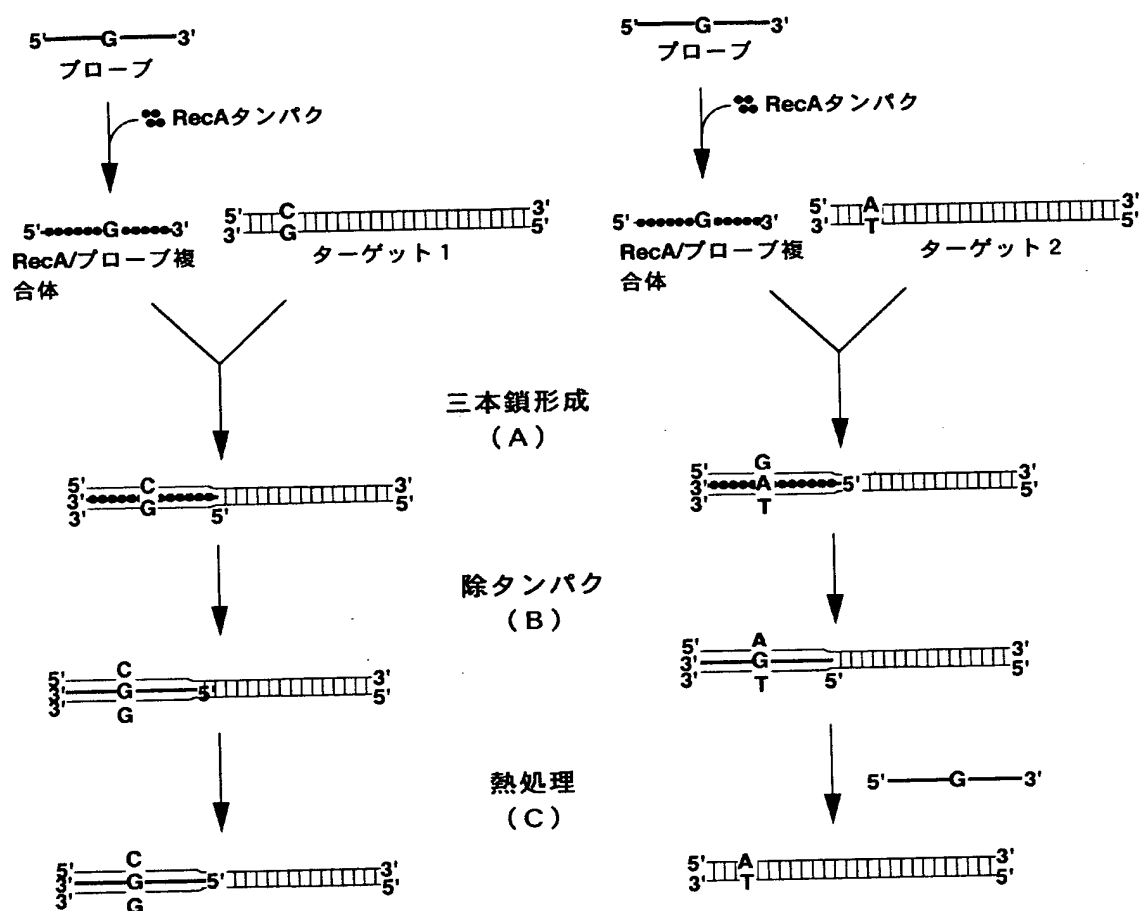
B



【図 10】

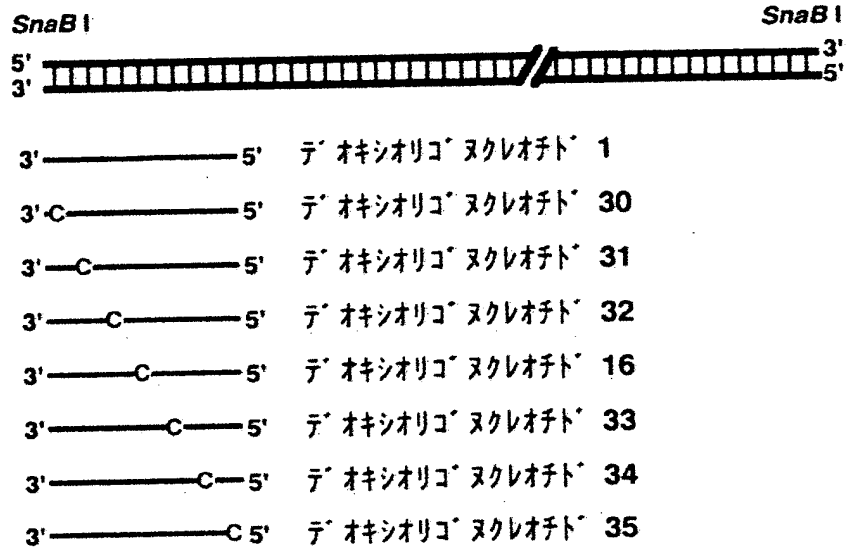


【図 11】

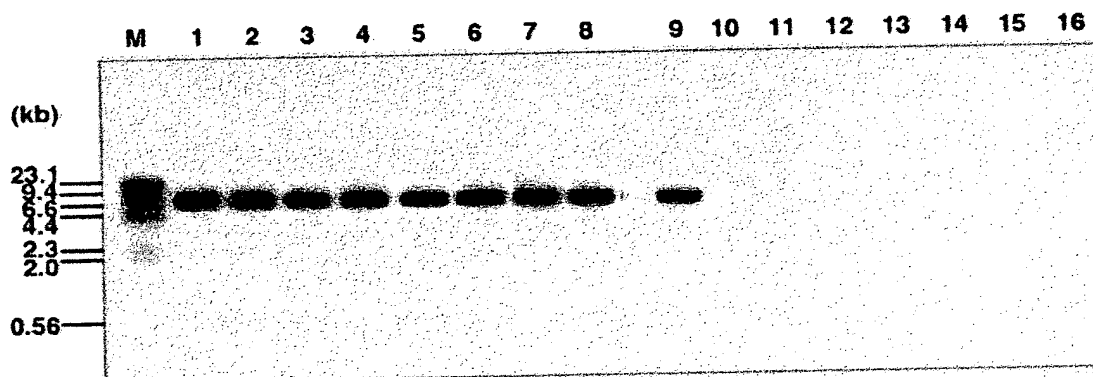


【図 12】

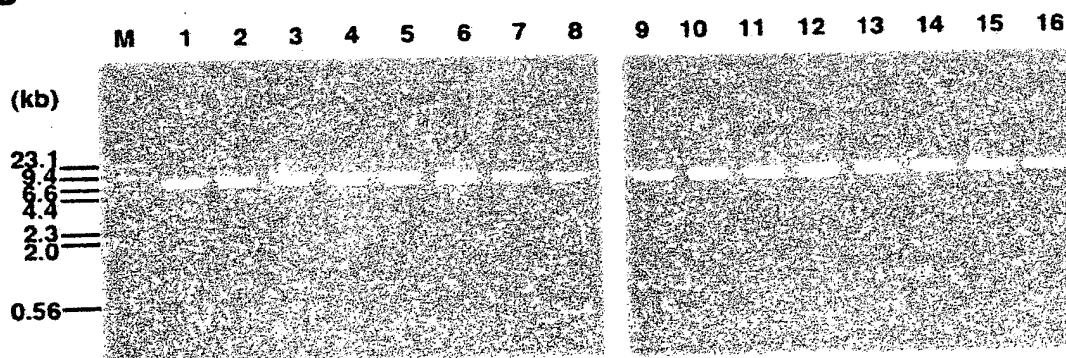
M13 mp18RF
nt. numbers



A



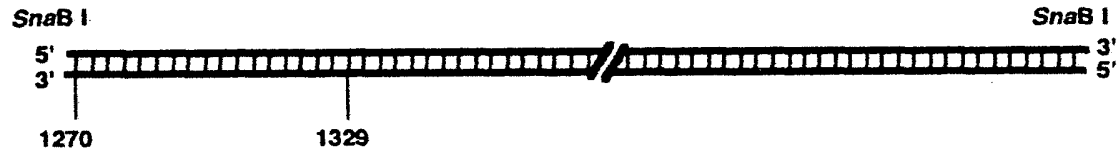
B



【図 13】

M13mp18RF

nt. numbers



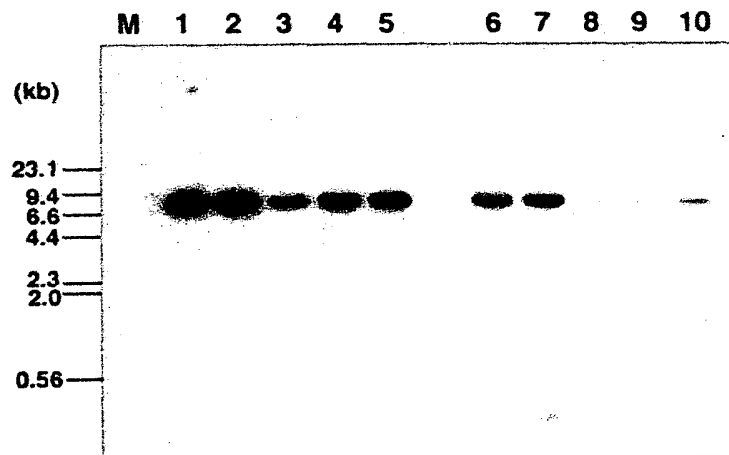
3' — G — 5' テ' オキシオリゴ'ヌクレオチド' 1

3' — (C) — 5' テ' オキシオリゴ'ヌクレオチド' 36

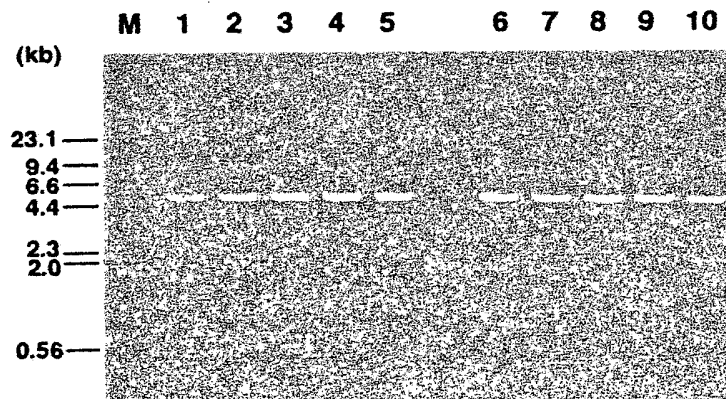
3' — C — 5' テ' オキシオリゴ'ヌクレオチド' 16

3' — C — 5' テ' オキシオリゴ'ヌクレオチド' 37

A



B



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、DNA中の多型の検出において長いDNA探索領域を必要とせず、検出感度の高い効率的なDNA多型の検出方法の提供を課題とする。

【解決手段】 相同組換えタンパク質であるRecAは、標的二本鎖DNAとその相補的オリゴヌクレオチドプローブから部分的三本鎖DNAを形成し、該三本鎖DNAは、RecAタンパク質を除いた後も安定に三本鎖DNA構造を維持する。本発明者らは、標的DNA中に多型が存在し、オリゴヌクレオチドプローブとミスマッチができると、三本鎖DNA構造の熱安定性に大きな変化が生じることを見出した。この熱安定性の変化を利用して、相同組換えタンパク質によって形成される三本鎖DNAに熱処理を施した後、オリゴヌクレオチドプローブが遊離し三本鎖DNAが解離するか否かを調べることにより、標的DNA中の多型を効率的に検出することが可能となった。

【選択図】 なし

特 2000-386361

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [593043200]

1. 変更年月日	1993年 3月 4日
[変更理由]	新規登録
住 所	愛知県刈谷市八軒町5丁目50番地
氏 名	株式会社アイシン・コスモス研究所

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [596175810]

1. 変更年月日 1996年12月 5日

[変更理由] 新規登録

住 所 千葉県木更津市矢那1532-3

氏 名 財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所



Creation date: 10-07-2003
Indexing Officer: HNGUYEN28 - HAO NGUYEN
Team: OIPEBackFileIndexing
Dossier: 09989526

Legal Date: 09-09-2002

No.	Doccode	Number of pages
1	IDS	3
2	FOR	31
3	NPL	28

Total number of pages: 62

Remarks:

Order of re-scan issued on